Untersuchungen über Phosphatasen der Mäuseniere: Biochemie und Verhalten unter dem Einfluß hoher Folsäure-Dosen

Rüdiger Hollatz

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0061

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Komm. Vorstand: Prof. Dr. J. K a l i c h
Arbeit unter Anleitung von Univ.Doz. Dr. K. T e m p e l

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PHOSPHATASEN DER MÄUSENIERE: BIOCHEMIE UND VERHALTEN UNTER DEM EINFLUSS HOHER FOLSÄURE-DOSEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
R Ü D I G E R H O L L A T Z
aus München

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Univ. Doz. Dr. K. Tempel
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. J. Tiews

Tag der Promotion: 2. Juli 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	PROBLEMSTELLUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1.	Zur Biochemie und Funktion der Lysosomen	2
2.1.1.	Definition	2
2.1.2.	Biochemie	2
2.1.3.	Funktion	3
2.1.4.	Biologische Bedeutung der Lysosomen	5
2.1.5.	Funktion der Lysosomen in Nierenzellen	7
2.2.	Zur Pathologie der Lysosomen	9
2.3.	Zur Biochemie und Funktion der Folsäure	11
2.4.	Zum Stoffwechsel der Folsäure beim Säuger	14
2.5.	Vorkommen von Folsäure in der Niere	15
2.6.	Zur Nierenschädigung durch extrem hohe Folsäuredosen	15
3.	MATERIAL UND METHODIK	19
3.1.	Reagentien	19
3.2.	Versuchstiere	21
3.2.1.	Haltung und Fütterung der Tiere	21
3.2.2.	Behandlung der Tiere	21
3.2.2.1.	Applikation von Folsäurelösungen	21
3.2.2.2.	Aufarbeitung der Tiere	21
3.2.2.3.	Verarbeitung der Nieren	22
3.3.	Bestimmung der Aktivität der Sauren Phosphatase	22
3.3.1.	Prinzip	22
3.3.2.	Lösungen	22
3.3.3.	Ausführung	23
3.4.	Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	23
3.4.1.	Prinzip	23
3.4.2.	Lösungen	23
3.4.3.	Ausführung	24
3.4.4.	Bezugsgrößen	24

		Seite
3.4.5.	Umrechnung von Extinktionsdifferenzen(ΔE) in internationale Millieinheiten (ImU)	24
3.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
3.5.1.	Prinzip	25
3.5.2.	Lösungen	25
3.5.3.	Ausführung	25
3.6.	Versuche zur Bindung von Phosphatasen der Mäuseniere an subzelluläre Strukturen	26
3.7.	Untersuchungen zur Wirkung von Folsäure auf die Mäuseniere	27
3.7.1.	Dosis- und Zeitabhängigkeit	27
3.7.2.	Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Niere in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt	27
3.7.3.	Zur Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Niere unter dem Einfluß von Ultraschall	27
3.8.	Sedimentierbarkeit von Phosphatasen, DNasen und Glutamat-Dehydrogenase der Mäuseniere vergleichend	28
3.8.1.	Bestimmung der Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase	28
3.8.1.1.	Prinzip	28
3.8.1.2.	Lösungen	28
3.8.1.3.	Ausführung	29
3.8.2.	Bestimmung der Aktivität der DNase I	29
3.8.2.1.	Prinzip	29
3.8.2.2.	Lösungen	29
3.8.2.3.	Ausführung	30
3.8.3.	Bestimmung der Aktivität der DNase II	30
3.8.3.1.	Prinzip	30
3.8.3.2.	Ausführung	30
3.9.	Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse	30
3.10.	Toxizitätsprüfung	31
3.10.1.	Methode nach KÄRBER	31
3.10.2.	Methode nach BEHRENS	32
3.10.3.	Probit-Analyse	32

		Seite
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	Zur Toxizität der Folsäure	34
4.1.1.	Männliche Mäuse	34
4.1.1.1.	Methode nach KÄRBER	34
4.1.1.2.	Methode nach BEHRENS	35
4.1.1.3.	Probit-Analyse	36
4.1.2.	Weibliche Mäuse	37
4.1.2.1.	Methode nach KÄRBER	37
4.1.2.2.	Methode nach BEHRENS	38
4.1.2.3.	Probit-Analyse	39
4.2.	Kontrollwerte	40
4.3.	Reaktionsbedingungen der Sauren Phosphatase	40
4.3.1.	pH-Optimum	40
4.3.2.	Ionen-Optimum, Kofaktoren, Inhibitoren	42
4.3.3.	Substratkonzentration	43
4.3.4.	Inkubationszeit	44
4.3.5.	Enzymkonzentration	44
4.3.6.	Inkubationstemperatur	45
4.4.	Reaktionsbedingungen der Alkalischen Phosphatase	46
4.4.1.	pH-Optimum	46
4.4.2.	Ionen-Optimum	47
4.4.3.	Substratkonzentration	48
4.4.4.	Inkubationszeit	49
4.4.5.	Enzymkonzentration	50
4.4.6.	Inkubationstemperatur	50
4.5.	Zur Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Mäuseniere	52
4.5.1.	Phosphataseaktivitäten bei differentieller Zentrifugation	52
4.5.2.	Zum Einfluß der Intensität des Homogenisationsvorgangs	54
4.5.3.	Zur Sedimentierbarkeit von Phosphataseaktivitäten der Niere in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung	55
4.5.4.	Versuche zur Differenzierung beider Phosphatasen im Sedimentationsverhalten	55

		Seite
4.5.5.	Sedimentierbarkeit von Phosphatasen und GLDH vergleichend	56
4.5.6.	Labilisierbarkeit der Phosphatasen der Niere der Maus	57
4.6.	Zur Wirkung von Folsäure auf die Niere der Maus	59
4.6.1.	Relatives Nierengewicht unter dem Einfluß von Folsäure	59
4.6.2.	Proteingehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure	63
4.6.3.	Aktivität der Sauren Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure	66
4.6.4.	Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure	68
4.6.5.	Phosphatase-Aktivitäten der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure: Statistische Bewertung der Ergebnisse	72
4.6.6.	Sedimentationsverhalten von Phosphatasen der Niere der Maus nach Folsäureeinwirkung	73
4.6.7.	Zur Wirkung membranlabilisierender Noxen auf das Sedimentationsverhalten von Phosphatasen der Niere der Maus nach Folsäureeinwirkung	75
5.	DISKUSSION	78
5.1.	Reaktionsbedingungen von Phosphatasen der Mäuseniere in vitro	78
5.1.1.	pH-Optimum	78
5.1.2.	Ionen-Optimum, Kofaktoren und Inhibitoren	78
5.1.3.	Substratkonzentration	79
5.2.	Zur Problematik von in vitro-Untersuchungen	80
5.3.	Vorkommen und biologische Bedeutung von Phosphatasen in der Niere	81
5.4.	Phosphatasen der Niere der Maus unter dem Einfluß hoher Folsäuredosen	82
5.4.1.	In vitro-Aktivitäten der Homogenate	82
5.4.2.	Subzelluläre Verteilung	84

		Seite
5.4.2.1.	Zur Isolierung subzellulärer Partikel	84
5.4.2.2.	Vorliegende Untersuchungen	86
6.	ZUSAMMENFASSUNG	88
	SUMMARY	91
7.	LITERATURVERZEICHNIS	94
	Lebenslauf	

1. PROBLEMSTELLUNG

Applikation hoher Folsäuredosen an Ratte und Maus führt zu einer vorübergehenden Nierenschädigung mit anschließender synchronisiert (d.h. mit gleicher biochemischer Phase) einsetzender intensiver Ribonucleinsäure-, Protein- und Desoxyribonucleinsäure-Synthese in Verbindung mit Zellteilungsvorgängen und Organvergrößerung (12,23,156).
Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner biochemischer Faktoren für den Ablauf von Wachstumsvorgängen bietet die Folsäure-Reaktion der Niere - bei einfacherer Handhabung und geringeren Versuchsausfällen - somit ähnliche experimentelle Vorteile wie die nach Teilhepatektomie regenerierende Rattenleber.

Befunde über das Verhalten zweier Hydrolasen mit Wirkung auf den Zellkern, der Desoxyribonuclease I und II, weisen auf eine Bedeutung von zellulären Abbau-Vorgängen für den Ablauf von Wachstum und Zellteilung hin (153). Zum Zwecke des Vergleichs wurde daher vorliegend das Verhalten zweier Phosphatasen der Mäuseniere nach Folsäureschädigung untersucht. Hierbei galt der subzellulären Verteilung der Enzyme, vor allem aber dem Verhalten der Lysosomenmembran, ein besonderes Interesse. Ferner sollten die wichtigsten Reaktionsbedingungen beider Phosphatasen der Mäuseniere festgelegt werden.

2. EINLEITUNG anhand der neueren Literatur

2.1. Zur Biochemie und Funktion der Lysosomen

2.1.1. Definition

Lysosomen sind im Tier- und Pflanzenreich (mit Ausnahme der Bakterien) ubiquitär verbreitete (89, 148), von einer einfachen Lipoproteidmembran umgebene, subzelluläre Partikel mit einem Durchmesser von 0,25 - 0,5 /u. Sie enthalten Hydrolasen, deren Wirkungsoptimum im sauren Bereich liegt. Hinsichtlich Form und Enzymausstattung bestehen große species-, organ-, gewebs- und funktionsspezifische Unterschiede (148, 151).

2.1.2. Biochemie

Da die intakt isolierten Lysosomen nur geringgradige Enzym-Aktivitäten (freie Aktivität) zeigen, muß eine strukturgebundene Latenz der Enzyme angenommen werden, die auf die umschliessende Membran zurückgeführt werden kann. Wird die Lysosomenmembran durch physikalische (mechanische Kräfte, Ultraschall, UV-Bestrahlung, ionisierende Strahlen, Hitze, Einfrieren und Auftauen) oder chemische (nichtionische Detergentien, freie Radikale, Digitonin, hepatotoxische Substanzen, die Vitamine A, D_2, K_1 und C, Lysolecithin u.a.m.) zerstört (41, 43, 99), werden die Enzyme freigesetzt. Erst dann läßt sich ihre Gesamtaktivität bestimmen. Aus der Differenz zwischen Gesamtaktivität und freier Aktivität ergibt sich die latente oder strukturgebundene Aktivität. Daneben gibt es auch eine Anzahl von Substanzen, die die Stabilität der Lysosomenmembran erhöhen. Dazu gehören u.a. Cholesterin, Corticosteroide, Chloroquin, Antihistaminica und Acetylsalicylsäure (64, 90, 145, 162). Das Spektrum der lysosomalen Enzyme (Tab.1) ermöglicht den vollständigen Abbau einer Zelle.

Tab. 1 : In Lysosomen nachgewiesene Enzyme

Proteasen und Peptidasen

Kathepsine A, B, C, D und E
Kollagenase
Arylamidase
Peptidase

Nucleasen

Saure Ribonuclease
Saure Desoxyribonuclease

Phosphatasen

Saure Phosphatase
Phosphoproteinphosphatase
Saure Pyrophosphatase
Phosphodiesterase
Phosphatidsäurephosphatase

Lipidabbauende Enzyme

Triglyceridlipase
Phospholipase
Esterase
Glucocerebrosidase
Galactocerebrosidase
Sphingomyelinase

Glycoproteine und Glycolipide abbauende Enzyme

β-N-Acetylhexosaminidase
α-N-Acetylhexosaminidase
β-Galactosidase
β-Glucosidase
α-Glucosidase
β-Mannosidase
α-Xylosidase
α-Fucosidase
Sialidase
Aspartylglucosylaminamidohydrolase
O-Seryl-N-acetylgalactosaminidglycosidase

Glucosaminoglycane abbauende Enzyme

Lysozym
Hyaluronidase
β-Glucuronidase
Arylsulfatasen A und B

2.1.3. Funktion

Die Lysosomen stellen einen digestiven Apparat der Zelle dar (128, 164), der zum enzymatischen Abbau zelleigener und zellfremder Substrate geeignet ist. Unter physiologischen Bedingungen wird die Zelle durch die lysosomale Membran vor einer Selbstverdauung geschützt. Man spricht heute in Anlehnung an SCHMIDT (zit. bei 128) vom vakuolären Apparat der Zelle. Nach deDUVE und WATTIAUX (43) besteht dieser aus primären Lysosomen, Prälysosomen, Lysosomen (Heterolysosomen und

Autolysosomen), Telolysosomen und Postlysosomen.
Bei der Endocytose (Phagocytose, Pinocytose) wird zellfremdes Material durch Invagination der Zellmembran inkorporiert. Dabei entsteht eine endocytotische Vakuole (Heterophagosom), die noch keine enzymatische Aktivität besitzt. Die Entwicklung zum Hydrolasen enthaltenden Heterolysosom (sekundäres Lysosom, digestive Vakuole) erfolgt durch Vereinigung des Phagosoms mit einem primären Lysosom oder einem Heterolysosom. Ob hierbei eines der beteiligten Partikel in das andere inkorporiert wird, oder eine Verschmelzung der Membranen beider Organellen erfolgt, ist noch nicht geklärt. Die primären Lysosomen sind Vakuolen, die hydrolytische Enzyme enthalten, aber noch keine lysosomale Aktivität ausüben. Über ihre Herkunft besteht noch keine volle Klarheit. Man nimmt an, daß die im " rauhen " endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Enzymproteine von vesikulären Bildungen des Golgi-Apparates umschlossen werden (43).
Im Heterolysosom werden die exogenen Substanzen (41, 43, 89, 99, 127, 151) den lysosomalen Hydrolasen ausgesetzt und nach Maßgabe der vorhandenen Enzymausstattung abgebaut. Man darf die Lysosomenmembran nicht als absolut undurchlässig auffassen. Verschiedene Befunde sprechen für die Möglichkeit temporärer Änderung der Permeabilität, die die Membran für niedermolekulare Spaltprodukte der hydrolytischen Aktivitäten durchlässig macht (LOCKWOOD, ALLISON; zit.bei 128).
Die Telolysosomen entstehen aus Heterolysosomen durch Anreicherung höhermolekularer, nicht weiter abbaubarer Rückstände bei gleichzeitiger Verminderung der enzymatischen Aktivität. Eine Ausschleusung (Exocytose) der lysosomal akkumulierten Rückstände im Sinne einer " zellulären Defäkation ", wie sie für Protozoen nachgewiesen ist (MÜLLER et al.; zit. bei 19), kann zum augenblicklichen Zeitpunkt für Metazoen noch nicht mit letzter Sicherheit postuliert werden. Hinweise in dieser Richtung geben die Untersuchungen von HAMPTON (zit. bei 34), der intravenös injiziertes Thorotrast (letzteres wird in den Lysosomen der Leber angereichert), 12 Std.p.i. in der Galle in hoher Konzentration wiederfand.

Ist eine derartige Exkretion nicht möglich, so verbleiben die mit unverdaulichen Rückständen beladenen Lysosomen unter völligem Verlust ihres Enzymgehalts als Postlysosomen (residual bodies) in der Zelle (115).

Neben ihrer Bedeutung für die Heterophagie spielen die Lysosomen auch eine wichtige Rolle im normalen Umsatz von Zellorganellen. Schon 1962 haben ASHFORD und PORTER (zit. bei 128) auf die " Foci " der physiologischen Autolyse hingewiesen. Hierbei handelt es sich um membranbegrenzte Organellen, die neben Ribosomen und Fragmenten des endoplasmatischen Retikulums vor allem Mitochondrien und Mitochondrienreste enthalten. Diese Strukturen sind als autophage Vakuolen (39), Cytosegresomen (52), Cytolysosomen (112, 114) oder Autolysosomen (43) bekannt. Die fokale zelluläre Autophagie beginnt mit einer intrazellulären Sequestrierung der abzubauenden Organelle durch deren Umhüllung mit einer zunächst zweischichtigen, später einschichtigen Membran, deren Herkunft und Entstehung noch völlig im Dunkeln liegen(von heterophagen Vakuolen?, aus dem endoplasmatischen Retikulum?)(164). Die so entstehenden Vesikeln, die noch keine hydrolytische Aktivität besitzen, werden als autophage Vakuolen, Autophagosomen, oder Cytosegresomen bezeichnet. Ihre Enzymbeladung (Entwicklung zu Autolysosomen) dürfte homolog den für die Heterolysosomen angegebenen Möglichkeiten erfolgen. Auch bei der Autophagie erfolgt die Bildung von Telolysosomen und Postlysosomen wie für die Heterophagie beschrieben.

2.1.4. Biologische Bedeutung der Lysosomen

Ihre besonderen biochemischen Eigenschaften verleihen den Lysosomen eine große Bedeutung für Physiologie und Pathologie der Zelle und somit auch für den Gesamtorganismus. So wird die in alternden oder abgestorbenen Zellen einsetzende abakterielle Autolyse durch die (durch Abfall des pH-Werts bedingte) erhöhte Labilität der Lysosomenmembran und die daraus resultierende Freisetzung saurer Hydrolasen bewirkt (148).

Die rasche postmortale Autolyse von Organen wie Leber, Niere und Milz erklärt sich aus deren hohen Gehalt an Lysosomen (99, 168). Bei zellulärer und allgemeiner Inanition kann sich die Zelle durch Heterolyse und Autolyse momentan nicht benötigter Zellorganellen für ihren Erhaltungsstoffwechsel reutilisierbare Kataboliten verschaffen (90, 99, 151).
Die Lysosomen der Leukozyten enthalten das die Bakterienwand angreifende Lysozym. Die Korrelation von Leukocytose, Lysosomenzahl und endocytierten Mikroorganismen läßt auf eine starke lysosomale Beteiligung bei biologischen Abwehrreaktionen schließen (43).

Zahlreiche Arbeiten belegen die Bedeutung von Lysosomen für die bei Differenzierung, Metamorphose oder Organregression auftretenden histiolytischen Prozesse: Regression der Müllerschen Gänge beim männlichen Hühnerembryo (21, 130, 131); postpartale Involution des Uterus (170, 171); zyklische Rückbildung des Corpus luteum (46); Involution der Milchdrüse (139); Amphibienmetamorphose (16, 28, 50, 53, 104, 165, 166).

Auch für die normale und pathologische Zellteilung kann eine lysosomale Beteiligung angenommen werden (4, 5, 89, 135). VORBRODT (161, 162) schließt aus seinen Befunden an der regenerierenden Rattenleber (wo er einen deutlichen Anstieg saurer Hydrolasen während der DNS-Synthese und der Periode der Zellteilung verzeichnete) auf spezifische Einflüsse der Lysosomen auf die Mitose. Dafür spricht auch das vermehrte Auftreten von Lysosomenmaterial im Zytoplasma vor Einsetzen der Zellteilung und deren Hemmbarkeit durch SH-Agentien (5). FAKAN (54) dagegen verzeichnete an 3 - 6 Tage nach Teilhepatektomie angesetzten Leberzellkulturen keine wesentliche lysosomale Beteiligung. Neuesten Untersuchungen (87) über das Verhalten lysosomaler Enzyme in der regenerierenden Rattenleber zufolge haben die Lysosomen für die Einleitung der Mitose keine Bedeutung, sie scheinen vielmehr als Träger der postmitotischen Autophagie eine hemmende Rolle bei der Leberregeneration zu spielen.

2.1.5. Funktion der Lysosomen in Nierenzellen

a.) Glomerulum: Über die Funktion der wenigen, zur Aufnahme von Ferritin und Peroxidase befähigten (55), lysosomenähnlichen Partikel in den Endothelzellen des Glomerulums ist noch nichts Näheres bekannt.

Die interkapillären Mesangiumzellen enthalten membranbegrenzte zytoplasmatische Strukturen unterschiedlicher Elektronendichte und verschiedenen Inhalts (55, 83, 100). Aufgrund histochemischer Untersuchungen von HAYASHI (zit. bei 96) ist anzunehmen, daß die meisten (wenn nicht alle) dieser Körperchen Lysosomen sind. Ihre physiologische Bedeutung scheint im Abbau von absorbierten Filtrationsrückständen und basalmembranähnlichen Materialien zu liegen, welche die Funktion der glomerulären Basalmembran schädigen könnten.

Auch in den Epithelzellen des Glomerulums finden sich " multivesikuläre " und " cytoplasmatische " Körperchen (15, 55, 83). Der Nachweis ihres lysosomalen Charakters gelang MILLER und PALADE (102), die saure Phosphatase-Aktivität in den " dense bodies " fanden. Die Lysosomen normaler Glomerulum-Epithelien scheinen für den Abbau von Protein, welches die glomeruläre Basalmembran durchdrungen hat, zuständig zu sein. Das vermehrte Auftreten von lysosomalen Strukturen in den Glomerulum-Epithelien bei vielen Nierenerkrankungen (15) spricht auch für deren Bedeutung in der Pathophysiologie der Glomerula.

b.) Juxtaglomerulärer Apparat: Die Epitheloidzellen der vasa afferentia enthalten normalerweise viele, relativ große Granula, von denen anzunehmen ist, daß sie Renin sezernieren (68). FISCHER und LEE et al. (zit. bei 96) konnten histochemisch auch Saure Phosphatase in den Partikeln nachweisen, was für deren lysosomale Natur spräche. SMITH und FARQUHAR (142) kamen aufgrund von Untersuchungen an Hormon-produzierenden Zellen der Epiphyse zu dem Schluß, daß in

sezernierenden Zellen den Lysosomen eine regulative Bedeutung bei der Verhinderung von Hypersekretionen zukommt.

c.) Proximaler Tubulus: Die Lysosomen der Zellen des proximalen Tubulus wurden 1954 biochemisch von STRAUS (143) als Hydrolasen enthaltende Partikel und im gleichen Jahre histochemisch von HOLT (zit. bei 96) als im Hinblick auf Saure Phosphatase positive Granula entdeckt. Sie sind identisch mit den von SJÖSTRAND 1944 erforschten " autofluoreszierenden Granula " und den wiederholt für Nierenzellen beschriebenen sog. hyalinen Tröpfchen. Die Tubulus-Lysosomen sind aufgrund ihrer differenzierten Enzymausstattung (Tab. 2) zum Abbau der verschiedensten Substrate befähigt.

Tab. 2 : In Lysosomen von Tubuluszellen nachgewiesene Enzyme

Saure Phosphatase	Aspartylglucosylaminamidhydrolase
β-Glucuronidase	β-N-Acetylglucosaminidase
Kathep in	Sialidase
Saure Ribonuclease	Arylamidase
Saure Desoxyribonuclease	Glucocerebrosidase
Arylsulfatase	Galactocerebrosidase
β-Galactosidase	Sphingomyelinase
α-Glucosidase	

Zwar zeigen alle in Tab. 2 aufgeführten Hydrolasen das Phänomen der Latenz. Sie lassen sich allerdings nicht im gleichen Maße freisetzen (137), was auf eine unterschiedliche Bindung in den Lysosomen schließen läßt. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen (52, 102) kann angenommen werden, daß die Zellen des proximalen Tubulus zur Resorption der verschiedensten Proteine und anderer hochmolekularer aus dem glomerulärem Filtrat stammenden Verbindungen befähigt sind. So konnte von STRAUS (143) die Aufnahme von Hühnereiweiß und Meerrettichperoxidase aus dem Tubuluslumen nachgewiesen werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß die Aufnahme durch Bildung von Phagosomen und deren Verschmelzung mit Saurer Phosphatase-positiven Partikeln erfolgt (111, 113). Auch die Resorption von Hämoglobin durch proximale Tubuluszellen konnte nachgewiesen werden (102). Unter physiologischen Bedingungen besteht die Hauptaufgabe der Tubulus-Lysosomen im Abbau von (nach glomerulärer Filtration) rückresorbiertem Protein (vor allem Albumin) (119). Nach SCHULTZE und HEREMANS (133) erfolgen 10 - 15 % des gesamten Albuminabbaus in der Niere.

d.) Henle'sche Schleife, distaler Tubulus und Sammelrohr

Die in diesen Abschnitten des Nephrons gefundenen Lysosomen sind weniger zahlreich und kleiner als jene des proximalen Tubulus (126). Über ihre Bedeutung für die Nierenphysiologie ist noch wenig bekannt.

2.2. Zur Pathologie der Lysosomen

Die vielfältigen Aufgaben der Lysosomen in der Zellphysiologie lassen erwarten, daß Mißbildungen oder Alterationen dieser Strukturen zu schweren Entgleisungen des Zellstoffwechsels führen können. Eine Anzahl von Thesaurosen konnte inzwischen als hereditärer lysosomaler Defekt erklärt werden: Das Fehlen eines (oder mehrerer) lysosomaler Enzyme bedingt dabei, daß bestimmte Stoffwechselprodukte für das Heterolysosom indigestibel bleiben. Durch Akkumulation solcher Stoffwechselprodukte kommt es zu dessen Vergrößerung (" congestive enlargement ") und schließlichen Inaktivierung. So ist die lysosomale Glykogenanreicherung beim Typ II der Glykogenspeicherkrankheit, der sog. POMPE's disease, durch das Fehlen der α-1,4-Glucosidase bedingt (71). Beim HURLER Syndrom scheint das Fehlen der Fucosidase für die vakuoläre Speicherung von Mucopolysacchariden verantwortlich zu sein (73), während beim Morbus TAY-SACHS (Anreicherung von G_{M2}-Monosialogangliosid) das Fehlen der lysosomalen N-Acetyl-β-galactosidase nachgewiesen ist (129).

Ein Mangel an Ceramidtrihexosidase bedingt beim Morbus FABRY die intrazelluläre Glykolipoidablagerung (25). Ähnliche lysosomale Enzymdefekte sind auch für Morbus GAUCHER (116), Morbus FARBER (120), Morbus NIEMANN-PICK (24), die Sulfatid-Lipoidose (zit. nach 151) und die metachromatische Leukodystrophie (10) nachgewiesen.

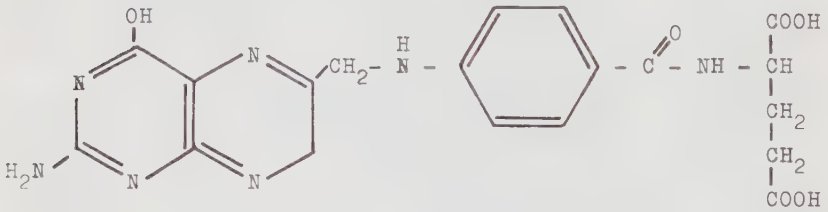
Unter gewissen Umständen können auch normale Lysosomen zu einer Gefahr für den Organismus werden. Am Beispiel von M. paratuberculosis und M. lepraemurium konnte gezeigt werden, daß aufgrund der hohen Resistenz dieser Erreger gegenüber bakteriziden und abbauenden Prozessen, diese bei hohen Infektionsquanten in einzelnen Phagolysosomen überleben können. Dabei finden sie im Lysosom einen idealen Nährboden, sind andererseits jedoch vor dem Zugriff " potenterer " Lysosomen geschützt (1). Auch bei Virus-Infektionen kann die heterolytische Aktivität von Lysosomen u.U. verhängnisvoll sein. REO-Viren sind bereits 15 - 60 min nach der Viropexis in Phagolysosomen nachweisbar. Durch die Aktivität proteolytischer Enzyme werden sie ihres Kapsids entkleidet (43) und gelangen somit zu voller Infektiosität. Demgegenüber ist ein Abbau des infektiösen Agens nicht möglich, da die lysosomale Enzymausstattung zur Spaltung doppelt helikaler RNS nicht geeignet ist (35).
Eine weitere von den Lysosomen ausgehende potentielle Gefahr für den Organismus besteht in der Möglichkeit, daß biologisch zunächst inaktive Substanzen durch lysosomale Enzyme zu toxischen Verbindungen abgebaut werden. Letzteres ist z.B. bei Lost-Konjugaten der Fall (zit. nach 151).
Ein wichtiger Aspekt für lysosomenbedingte Zellschädigungen ergibt sich aus der Tatsache, daß jede Alteration der Lysosomenmembran zu einer Herabsetzung, wenn nicht Aufhebung, der enzymatischen Latenz führen kann. Deren Ergebnis ist unkontrollierbare zelluläre Autolyse. Die bei Kälbern und Lämmern durch Vitamin E- und Selenentzug auslösbare Muskeldystrophie (sog. " Weißfleischigkeit ") könnte somit als Folge lysosomaler Membranschädigung gedeutet werden: Sowohl Vit. E als auch Selen wirken als antioxydative Substanzen der membranschädigenden Lipidperoxydbildung entgegen.

Für praktisch alle degenerativen und entzündlichen Prozesse kann eine lysosomale Beteiligung angenommen werden (167). Für ischämische und toxische Leberschädigungen, den ischämisch geschädigten Darm, Milzmakrophagen nach hämolytischem Schock, Leukozytenschäden durch Bakterientoxine und Viren, nach Photosensibilisierung bestrahlte Haut, Krankheiten des rheumatischen Formenkreises, Muskelquetschungen u.a.m. konnte eine Erhöhung der freien Aktivität lysosomaler Enzyme nachgewiesen werden (89, 127, 151). Es bleibt jedoch die Frage offen, ob die erhöhte lysosomale Aktivität hierbei von kausaler Bedeutung für die Pathogenese oder nur als Beginn der Nekrolyse in der bereits geschädigten Zelle zu verstehen ist.
Auch für die Kanzero- und Teratogenese kann eine Beteiligung der Lysosomen in Betracht gezogen werden, da praktisch alle bekannten chemischen, physikalischen und viralen mutagenen Noxen zu erhöhter Lysosomenfragilität führen, und außerdem der experimentelle Nachweis für die Auslösbarkeit von Chromosomenschäden durch Eindringen von Hydrolasen in den Zellkern erbracht werden konnte (6, 134, 135). Auch das Tumorwachstum geht offenbar mit erhöhter Aktivität einiger lysosomaler Enzyme einher, besonders wenn sich Um- und Abbauvorgänge im Tumorgewebe nachweisen lassen (7, 26, 51, 77, 85, 92, 110, 134, 135, 140).

2.3. Zur Biochemie und Funktion der Folsäure

Die Folsäure = Pteroylmonoglutaminsäure = N-[-4-(2-Amino--4-hydroxy-6-pteridyl-methyl-amino)-benzoyl]-glutaminsäure wurde zunächst als Vitamin entdeckt und isoliert (DAY, 1938: Vit.M ; STOKSTAD und MAUNSSING, 1938: Faktor U ; HOGAN und PARROT, 1939: Vit. B_c; SNELL und PETERSON, 1940: Lactobacillus-casei-Faktor). Sie gehört chemisch zu den Pterinen, deren Gruppenmerkmal der Pteridinring, ein heterozyklisches System aus einem Pyrimidin- und einem Pyrazinring, ist. Die Pterine - in der Natur weit verbreitet - sind ausnahmslos Farbstoffe. Sie sind, teils als Insektenpigmente (wie das

Xanthopterin bei Zitronenfalter und Wespe), teils als Wuchsstoffe für Einzeller (wie das Biopterin für Crithidia fasciculata, welches auch im Futtersaft der Bienenkönigin-Larven (Gelee royal) vorkommt) biologisch von Bedeutung (86). Im Folsäuremolekül sind außer dem substituierten Pteridinring noch die p-Aminobenzoesäure und die Glutaminsäure enthalten, so daß sich folgende Strukturformel ergibt:



In der Natur kommt die Folsäure meist in gebundener Form als sogenanntes Konjugat vor. Solche Konjugate sind z.B. die 5 Methyl-tetrahydrofolsäure (prefolic A), die Pteroyldiglutaminsäure und die Pteroylhexaglutaminsäure, bei welcher 6 Glutaminsäuren über die γ-Carboxylgruppen peptidartig verknüpft sind. Folsäurekonjugate finden sich in Leber, Niere, Muskel, Milch und Blattgemüse. Die Freisetzung von Folsäure aus der Peptidform erfolgt durch das in Leber, Pankreas, Darmmucosa, Niere, Milz und Hirn enthaltene Enzym Vit. B_c-Konjugase (γ-Glutamylcarboxypeptidase). Ein weiteres Folsäure-Derivat ist die N^5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (Folinsäure, Leucoverin, Citrovorum-Faktor), ein Wuchsstoff für das Bakterium Leuconostoc citrovorum. Die Tetrahydrofolsäure (Coenzym F) ist die biologisch wirksame Form der Folsäure. Das Coenzym F bindet im Stoffwechsel entstehende C_1-Fragmente (Formylgruppen, Formiationen, Methylgruppen u.a.) und überträgt sie als N^{10}-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (aktive Ameisensäure).

Durch Reduktion entsteht aus der Folsäure Dihydrofolsäure (DHF) und Tetrahydrofolsäure (THF). Beide Derivate verbinden sich enzymatisch mit Formaldehyd, jedoch ist die Dissoziationskonstante von Formyl-THF 300mal geringer (19). DHF kann durch Dihydrofolatreduktase wie folgt in THF umgewandelt werden (ibid.):

$$DHF + NADPH + H^+ \rightleftharpoons THF + NADP^+$$

Das gleiche Enzym katalysiert auch die direkte Umwandlung von Folsäure in THF:

$$\text{Folsäure} + 2\ NADPH + 2\ H^+ \rightleftharpoons THF + 2\ NADP^+$$

Zwei weitere biologisch bedeutsame Folsäurederivate sind das Methenyl-THF und das Methylen-THF (ibid.):

$$\text{Formyl-THF} \rightleftharpoons \text{Methenyl-THF} + H_2O$$

$$THF + HCHO \rightleftharpoons \text{5,10-Methylen-THF}$$

Folsäurederivate spielen eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Synthese von Pyrimidin und Purin-Nucleotiden. So erfolgt die Umwandlung von Uridin in Thymidin (durch Thymidilat-Synthetase katalysiert) nach folgender Reaktion (57):

$$\text{d-Uridinmonophosphat} + \text{5,10-Methylen-THF} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{Thymidinmonophosphat} + DHF$$

Bei der Biosynthese von Purinnucleotiden sind Folsäurederivate sowohl an der Bildung des Imidazol- als auch des Pyrimidinrings beteiligt (60, FRIEDKIN et al.zit. bei 19):

$$\text{2-Amino-N-ribosylacetamid-5'-phosphat} + \text{Methenyl-THF} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{2-Formamido-N-ribosylacetamid-5'-phosphat} + THF$$

$$\text{5-Amino-1-ribosyl-4-imidazolcarboxamid-5'-P} + \text{10-Formyl-THF} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{5-Formamido-1-ribosyl-4-imidazolcarboxamid-5'-P} + THF$$

Auch bei der Synthese und im Metabolismus von Aminosäuren sind Folsäure-Derivate als Überträger von C_1-Fragmenten (Ameisensäure, Methylgruppen von Cholin, Methionin und Azeton, meist aber Formaldehyd) von biologischer Bedeutung.

2.4. Zum Stoffwechsel der Folsäure beim Säuger

Resorption

Oral aufgenommene Folsäure wird im ersten Drittel des Dünndarms der Ratte sehr schnell resorbiert. Die Resorption von Folsäure scheint auf einem aktiven Transportmechanismus zu beruhen. Bei Anlegung eines Konzentrationsgefälles zwischen Mucosa- und Serosaseite des Rattendarms war der Fluß von Mucosa zu Serosa 14fach stärker als in umgekehrter Richtung (BURGEN u. GOLDBERG, zit. bei 19).

Verteilung und Speicherung

Wird Folsäure parenteral appliziert, so verschwindet sie in kürzester Zeit aus dem Blut. Schon 3 min nach Folsäureinjektion in einer Dosis von 15 mg/kg ist beim Menschen der Serumfolsäurespiegel um 60 % abgefallen (19). Da in diesem Zeitraum diese Menge nicht glomerulär filtriert werden kann, muß die Folsäure von Gewebezellen aufgenommen worden sein. NEAL und WILLIAMS (zit. bei 19) fanden 24 Std. nach Injektion von markierter Folsäure bei der Ratte die Hälfte der nicht ausgeschiedenen Radioaktivität in Leber, Niere, Milz, Hoden und Darm. Für die Annahme, daß wirklich originäre Folsäure und nicht irgendwelche biologisch unwirksamen Abbauprodukte gespeichert werden, spricht die Beobachtung von JOHNS et al. (zit. bei 19). Diese Autoren fanden nach Applikation von H^3-markierter Folsäure im Wasser des Harns keine Radioaktivität, wie sie bei intensivem Abbau zu erwarten gewesen wäre. Die Speicherung in der Niere erfolgt ausschließlich in den Tubuluszellen, wahrscheinlich durch Bindung an Dihydrofolatreduktase, welche in der Niere in beträchtlichem Ausmaß vorhanden ist (19).

Ausscheidung

Die Folsäure wird normalerweise (bei physiologischen Plasma-Konzentrationen) nach glomerulärer Filtration in den Tubuli zum Teil rückresorbiert (CONDIT u. GROB, zit. bei 19),

wobei die Rückresorption beim Menschen ca. 0,03 mg/min beträgt. Steigt die Folsäurekonzentration im Plasma auf über 10 mg/l an, so unterbleibt eine Rückresorption vollkommen (GORESKY et al.; zit. bei 19).

2.5. Vorkommen von Folsäure in der Niere

Der normale Folsäuregehalt der Niere unterliegt großen tierartlichen und individuellen Schwankungen (8). Innerhalb der Gruppe der Poikilothermen wurden Unterschiede von einer halben Größenordnung festgestellt. So enthält die Niere des Neunauges Entosphenus japon. 0,53 mg/g, die von Mogul cephalus 0,69 mg/g und jene von Limanda angustrostris 2,85 mg/g (74). Für das Geflügel liegen nur Angaben über das Huhn vor. Die Werte schwanken zwischen 0,05 und 2,6 mg/g (LASKOVSKY et al.; zit. bei 8). Der Folsäuregehalt von Säugernieren wurde von HUENNECKENS et al. (79) untersucht. Hier werden für die Ratte 14, für die Maus 4, für das Schwein 1 und für das Rind 0,5 mg/g angegeben. Trotz ihres hohen Folsäuregehalts kann die Niere jedoch nicht als primäres Speicherorgan für Folate angesehen werden, da junge Ratten nach Folsäureentzug und anschließender i.v. Injektion von 20 mg/kg in der Leber einen 5fach höheren Folsäuregehalt aufweisen als in der Niere (61).

2.6. Zur Nierenschädigung durch extrem hohe Folsäuredosen.

Wird Folsäure in extrem hohen Dosen appliziert, so kommt es akut zu einer hochgradigen Nierenschädigung. Diese tritt pathologisch anatomisch am augenfälligsten in Form einer massiven Ödematisierung in Erscheinung. BRADE et al. (23), die Ratten in 0,3M Na-Bikarbonat gelöste Folsäure in einer Dosis von 500 mg/kg injizierten, beobachteten nach anfänglicher Anurie (zwischen 4 und 8 Std. p.i.) eine deutliche Störung der Nierenfunktion. Am 4. Tag p.i. waren bei bestehender Oligurie

die Inulinclearance[+)] gegenüber den Kontrolltieren um rund 75 % und die PAH-Clearance[++)] um 50 % vermindert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (ibid.) zeigen bereits 1 Std. nach Folsäureinjektion (500 mg/kg) in einem Teil der Zellen des proximalen Tubulus Mitochondrienschwellungen mit Verlust der Matrixstruktur und Verstreichen der Cristae. An vielen Zellen sind die basalen Einfaltungen (basales Labyrinth) verstrichen. Die apikale Zellmembran ist vielerorts blasenartig ins Lumen vorgestülpt. Auch die Mikrovilli sind blasig umgeformt oder zerfallen. Im Lumen des Hauptstücks bilden sich Zylinder aus Zelldetritus mit nadelförmigen Folsäurekristallen, deren Dichte zum Überleitungsstück hin zunimmt. Nach 4 Tagen steht das elektronenmikroskopische Bild bereits deutlich im Zeichen der Regeneration. Die Tubuli sind wieder frei, die Mitochondrien regenerieren, die Nucleoli sind vergrößert und die Ribosomen vermehrt. Ferner treten neue Zellen auf, die fast völlig durch zu Polysomen zusammengelagerte Ribosomen ausgefüllt sind (ibid.). Die Regeneration der Niere nach Folsäureschädigung erfolgt in einem derart " überschießenden " Maße, daß eine starke Hyperplasie entsteht.

+) Das (exogen zugeführte) Fructosepolymerisat Inulin wird im Glumerulum filtriert und darüberhinaus weder rückresorbiert noch zusätzlich in den Tubuli sezerniert. Unter Clearance versteht man diejenige Plasmamenge, die pro Zeiteinheit bei der Nierenpassage von einem bestimmten Stoff gereinigt wird. Die Inulinclearance ist Meßgröße für die g l o m e r u l ä r e F i l t r a t i o n s r a t e.

++) p-Aminohippursäure (PAH) wird neben der glomerulären Filtration zusätzlich tubulär sezerniert, so daß ihre Konzentration im Nierenvenenblut gegen Null geht. Die PAH-Clearance gilt als Maß des r e n a l e n P l a s m a f l u s s e s.

Zwar gilt die Niere (wie die Leber und die meisten Drüsen) als ausgesprochen langsam proliferierendes Organ (117). Unter gewissen Bedingungen können jedoch auch diese langsam proliferierenden Organe zu massiver Zellteilung angeregt werden. So die Leber durch Teilhepatektomie (49), die Speicheldrüsen durch Isoproterenol und die Niere durch z.B. einseitige Nephrektomie (82), temporäre Ischämie infolge Ureterligatur (32) und Sublimatvergiftung (33). Die Folsäurereaktion der Niere übertrifft in ihrem Ausmaß alle genannten Modelle einer induzierten Mitosesteigerung (160).
Bereits 1 Std. nach Folsäureinjektion (250 mg/kg) ist in der Niere der Ratte ein Anstieg des Gehalts an "basischem Zellkernprotein" zu verzeichnen (157). Nach 18 Std. deutet sich ein weiterer Anstieg an, der nach 20 Std. sein Maximum durchläuft (ibid.). Zugleich mit der nucleären Proteinsynthese beginnt auch die RNS-Bildung. Sie ist nach 12 Std. maximal. Der Anstieg der DNS-Synthese setzt nach 18 Std. ein und umfaßt 32 Std. p.i. gegenüber den Kontrollen ungefähr das 2ofache (ibid., 156). Mit einer Zeitverschiebung von wenigen Stunden schließt sich eine gleichsinnige und im Umfang gleichwertige Erhöhung der Mitoserate an (ibid.). Anstieg der DNS-Synthese und Erhöhung der Mitoserate sind am stärksten in der äußeren Medulla. Die hier erhaltenen Werte übertreffen jene aus der Cortex bzw. inneren Medulla um das 2 bzw. 5fache (156).

Für die Wirkung von Folsäure auf die Niere ist wahrscheinlich der Pteridinanteil verantwortlich (22). Dafür spricht die Tatsache, daß außer der Folsäure auch die Pteridinderivate Xanthopterin und 2-Amino-4-hydroxypteridin in äquimolarer Dosierung homologe Veränderungen bewirken, während die Folsäurebestandteile 4-Aminobenzoylglutamat bzw. Glutaminsäure unwirksam sind (23). Der Mechanismus, der zu Hypertrophie und Hyperplasie führt, ist noch nicht voll geklärt (75). TAYLOR et al. (75) kamen auf Grund physiologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen zu dem Schluß, daß es sich bei der Nierenvergrößerung um die Folge einer unspezifischen Wirkung (Schädigung des Tubulusepithels) und nicht - wie früher angenommen -

um " chemische Induktion " (158) handelt.
Die Autoren sehen die Ursache der Nierenvergrößerung in Retention der Folsäure in der Niere, wobei es durch Präzipitation in den Tubuli zu einer Blockade der Funktion kommt. Aufgrund neuester Untersuchungen kann angenommen werden, daß die Folsäurehyperplasie nicht direkt pteridinbedingt ist, sondern im Prinzip eine Regeneration nach Schädigung darstellt (160). Hierbei kommen zwei Faktoren zusammen, nämlich die Zerstörung der apikalen Zellmembran durch Auskristallisation in den Tubuli und ein ischämischer Effekt durch Zunahme des intrakapsulären Drucks infolge Blockade der Tubuli.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien

1. Aethanol 96 %ig, mit Petroläther vergällt, Fa. HEMMETER, München
2. Äthylendiamintetraacetat, 4 mM, Biochemica Test Combination GLDH, BOEHRINGER MANNHEIM Nr. 15995
3. Ammoniumacetat, 3,2 M, Biochemica Test Combination GLDH, BOEHRINGER MANNHEIM Nr. 15995
4. Chloroform, DAB 6, MERCK Nr.2431
5. Desoxyribonucleinsäure, Na-Salz, aus Kalbsthymus, hochmol., mind. 95 % DNS, MG 8900000, N ca. 14,5 %, P ca. 8 %, EGA Chemie KG, Steinheim
6. Di-Natrium-4-nitrophenylphosphat (Hexahydrat), (pNPP), MERCK Nr. 6850
7. Essigsäure, 99 - 100 % (Dichte etwa 1,05), p.A. MERCK Nr. 90063
8. Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure), krist., pharm., SERVA Nr. 21700
9. Glycocoll nach SÖRENSEN, Puffersubstanz, MERCK Nr. 4201
10. Kaliumacetat, reinst, MERCK Nr. 4820
11. Kaliumjodid, p.A., MERCK Nr. 5043
12. Kaliumnatriumtartrat, Seignettesalz, p.A., MERCK Nr. 8087
13. α-Ketoglutarat, 0,41 M, Biochemica Test Combination GLDH, BOEHRINGER MANNHEIM Nr. 15995
14. Kupfer-(II)-sulfat, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, p.A., MERCK Nr. 2790
15. Magnesiumchlorid. $MgCl_2 \cdot 2\ H_2O$, p.A., MERCK Nr. 5833

16. Natriumacetat, wasserfrei, p.A., RIEDEL-DE-HAEN Nr. 32319

17. Natriumchlorid, krist., p.A., MERCK Nr. 6404

18. Natriumhydrogenkarbonat (Natrium bicarbonicum) MERCK Nr. 6329

19. Natronlauge, TITRISOL ®, 0,1 N, MERCK Nr. 9959

20. Saccharose, reinst, krist., rechtsdrehend in Wasser, SCHUCHARDT Nr. SU 142

21. Salzsäure, TITRISOL ®, 0,1 N, MERCK Nr. 9973

22. Triäthanolaminpuffer, 50 mM, pH = 8,0, Biochemica Test Combination GLDH, BOEHRINGER MANNHEIM Nr. 15995

23. Trichloressigsäure (TCE), p.A., MERCK Nr. 807

24. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Puffersubstanz, MERCK Nr. 8382

25. Triton X 100 ®, SERVA Nr. 37230

26. Zinksulfat, $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, p.A., MERCK Nr. 8883

3.2. Versuchstiere

Als Tiermaterial dienten ca. 800 weibliche Albinomäuse. Die Tiere stammten teils aus institutseigener Zucht, teils aus einem NMRI-Inzuchtstamm der Fa. WIGA (Versuchstierzuchtanstalt Willi Gaßner, Ottobrunn/München).
Bei Versuchsbeginn hatten die Mäuse ein Gewicht von 20 $\pm$ 2,0 g.
Soweit männliche Tiere zur Anwendung kamen, ist dies im Ergebnisteil besonders vermerkt.

3.2.1. Haltung und Fütterung der Tiere

Die Mäuse wurden vor den Versuchen in Makrolonkäfigen nach SPIEGEL und GÖNNERT (37 x 25 x 15) in Gruppen von ca. 20 Stück und während der Versuche in zylindrischen Glasgefäßen (20 x 20) in Gruppen von ca. 5 Stück gehalten. Verfüttert wurde ALTROMIN ® - Pressfutter (Altrogge-Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe). Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.2.2. Behandlung der Tiere

3.2.2.1. Applikation von Folsäurelösungen

Folsäure wurde kurz vor der Injektion in wässrigen Lösungen von 0,3 M Na-Bikarbonat gelöst und mit einer Tuberkulinspritze (Kanüle Nr. 20) in eine Schwanzvene injiziert. Die Konzentration der Folsäurelösungen war so gewählt, daß die Applikation von 1/100 ml/g Körpergewicht die gewünschte Wirkstoffmenge (in mg/kg K.-Gew.) ergab.

3.2.2.2. Aufarbeitung der Tiere

Die Mäuse wurden in einem Glaszylinder mit Chloroform bis zum Stadium IV der Narkoseskala nach GIRNDT betäubt, mit einem Scherenschlag dekapitiert und entblutet. Anschließend wurden die Nieren entnommen und die Kapseln abgezogen.

3.2.2.3. Verarbeitung der Nieren

Die Nieren wurden im frischen Zustand gewogen und im Verhältnis 1 : 10 (G/V) mit physiologischer NaCl-Lösung bzw. (bei den Sedimentationsversuchen) mit 0,25 M wässriger Saccharoselösung versetzt. Anschließend wurden die Nieren mit einem Homogenisator vom Waring Blendor Typ (Fa.BÜHLER, Tübingen) 2 min bei ca. 30000 U/min unter Eiswasserkühlung homogenisiert. Hierzu wurden ca. 25 ml fassende Glasgefäße und ein 4-Flügelmesser mit 18 mm Ø verwendet. Die für Sedimentationsversuche bestimmten Nieren wurden in einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM (B.BRAUN App.-Bau, Melsungen) 1 min bei 8000 U/min unter 5maligem Auf- und Abbewegen des Glasgefäßes bei Eiswasserkühlung homogenisiert. Es wurden Glasgefäße mit einem Fassungsvermögen von 30 ml und Teflonkolben mit V_2A-Stahlkolbenstange verwendet. Die Homogenate wurden entweder sofort verarbeitet, oder bei -15°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3. Bestimmung der Aktivität der Sauren Phosphatase

3.3.1. Prinzip

p-Nitrophenylphosphat (3.1.6.) zerfällt bei Anwesenheit von Phosphomonoesterasen in Phosphat und p-Nitrophenol. Die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenolmenge ist der Phosphataseaktivität proportional und kann nach Zusatz von Natronlauge (3.1.19.) aufgrund der gelbgrünen Farbentwicklung spektrophotometrisch gemessen werden.

3.3.2. Lösungen

a.) Natriumacetat-Puffer: eine 0,1 M wässrige Natriumacetatlösung (3.1.16.) und eine 0,1 M Essigsäurelösung (3.1.7.) wurden auf 30°C erwärmt. Die Natriumacetatlösung wurde mit der Essigsäurelösung auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt (pH-Meter: Typ 286, Fa.RADIOMETER,Dänemark)

b.) 0,1 N NaOH (3.1.19)

c.) 4-Nitrophenylphosphat: (3.1.6.) 16,5 mg dieses Substrates wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in 10 ml des Acetat-Puffers gelöst.

3.3.3. Ausführung

0,1 ml des 1 : 400 verdünnten Nierenhomogenates wurden mit 1 ml Puffer-Substrat-Lösung 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 5 ml 0,1 N NaOH vermischt. Beim Leerwert wurde das Homogenat erst nach dem Abstoppen der Reaktion zugesetzt. Von der bei 405 m/u gegen 0,1 N NaOH in 1 cm Glasküvetten gemessenen (Spektralphotometer PMQ II, Fa. C.ZEISS, Stuttgart-Oberkochen) Extinktionsdifferenz wurde der Leerwert abgezogen. Die erhaltene Differenz ist der Enzymaktivität proportional.

3.4. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

3.4.1. Prinzip: s.: 3.3.1.

3.4.2. Lösungen

a.) Glycin-NaOH-Puffer: 0,3753 g Glycocoll (3.1.9.) und 0,2935 g NaCl (3.1.17.) wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösung und eine 0,05 N Lösung von NaOH in CO_2-freiem Wasser wurden auf 30°C erwärmt. Anschließend wurde die Glycin-NaCl-Lösung mit der alkalischen Komponente auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. In 100 ml dieses Puffergemisches wurden 0,010165 g $MgCl_2$ (≙ 0,001 M) gelöst.

b.) 0,1 N NaOH

c.) 4-Nitrophenylphosphat

3.4.3. Ausführung

0,1 ml des 1 : 2400 verdünnten Homogenates und 1 ml Glycin-NaOH-Puffer wurden 30 min bei 30°C inkubiert. Beendigung und Messung der Reaktion erfolgten im übrigen wie bei der Sauren Phosphatase.

3.4.4. Bezugsgrößen

Als Bezugsgrößen für beide Hydrolasen dienten die Gew.-Einheit Frischgewicht, das relative Organgewicht und die Proteinkonzentration des Ansatzes.

3.4.5. Umrechnung von Extinktionsdifferenzen(ΔE) in internationale Millieinheiten (ImU)

$$\text{Aktivität (ImU/ml)} = \frac{\Delta E \cdot 1000 \cdot V \cdot F_v}{\text{min} \cdot \varepsilon \cdot d \cdot v}$$

Erläuterung der Indices:

ΔE = Extinktionsdifferenz bei 405 m/u nach 30 min
V = Gesamtvolumen
v = Probevolumen
F_v = Verdünnungsfaktor des Homogenats
ε = Extinktionskoeffizient bei 405 m/u = 18,5 $\frac{cm^2}{Mol}$
d = Schichtdecke der Küvette

Unter den gewählten Bedingungen errechneten sich die Phosphataseaktivitäten in ImU/mg Nierenfrischgewicht wie folgt:

a.) Saure Phosphatase:

$$\text{ImU/mg} = \Delta E \cdot \frac{6,1 \cdot 400}{30 \cdot 18,5 \cdot 1 \cdot 0,1}$$

b.) Alkalische Phosphatase:

$$\text{ImU/mg} = \Delta E \cdot \frac{6,1 \cdot 2400}{30 \cdot 18,5 \cdot 1 \cdot 0,1}$$

3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.5.1. Prinzip

Die Proteinkonzentration wurde mit der von BÜCHER at al. vereinfachten Biuretmethode gemessen (14). Bei Zusatz von Kupfersulfat zu einer alkalischen Polypeptidlösung entsteht Biuret aus 2 Molekülen Harnstoff unter Abgabe von einem Molekül Ammoniak. Die dabei auftretende violette Farbe hat ihr Extinktionsmaximum bei 546 m/u. Die Extinktionsdifferenz zwischen proteinhaltigem Reaktionsgemisch und proteinfreiem Reagentien-Leerwert ist der Proteinkonzentration proportional. Der Umrechnungsfaktor Extinktionsdifferenz ⟶ Proteinkonzentration ist in gewissem Umfang von der Proteinkonzentration abhängig (106).

3.5.2. Lösungen

a.) Biuretreagens: 9 g Seignettesalz (3.1.12.) wurden in ca. 400 ml 0,2 N NaOH gelöst. Der Lösung wurden nacheinander 3,0 g feingepulvertes Kupfersulfat (3.1.14.) und 5,0 g Kaliumjodid (3.1.11.) zugesetzt. Dabei mußte jedes Salz vor Zugabe des nächsten vollständig gelöst sein. Anschließend wurde die Lösung mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml ergänzt. Das Reagens wurde während der Versuche im Dunkeln aufbewahrt.

b.) 3,6 M wässrige TCE-Lösung (3.1.23.)

3.5.3. Ausführung

0,85 ml eines im Verhältnis 1 : 50 verdünnten Nierenhomogenates wurden mit 0,15 ml 3,6 M TCE versetzt. Nach 20 min.Zentrifugieren bei 6000 U/min (Laborzentrifuge, Typ JUNIOR II der Fa. CHRIST, Osterode) und Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 4,9 ml Aqua dest. aufgewirbelt und mit 5 ml Biuretreagens vermischt. Nach 30 min wurde die Extinktionsdifferenz gegenüber dest. Wasser in 2 cm Glasküvetten bei 546 m/u gemessen.

Von dem erhaltenem Wert wurde der Reagentien-Leerwert, bestehend aus 5 ml Biuretreagens und 5 ml dest. Wasser, abgezogen. Die Differenz ist dem Proteingehalt des Ansatzes proportional.

3.5.4. Berechnung des Proteingehalts

$$\text{Proteingehalt (mg/g)} = \frac{\Delta E \cdot \varepsilon \cdot F_v}{v}$$

Erläuterung der Indices:

ΔE = Extinktionsdifferenz bei 456 m/u

ε = empirisch ermittelter Umrechnungsfaktor = 17

F_v = Verdünnungsfaktor des Homogenats

v = Probevolumen

Unter den gewählten Bedingungen ergab sich:

$$\text{mg/g} = \Delta E \cdot \frac{17 \cdot 50}{0{,}85}$$

3.6. Versuche zur Bindung von Phosphatasen der Mäuseniere an subzelluläre Strukturen

Hierzu wurden die mit dem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM hergestellten Homogenate mit Saccharose auf 1 : 50 weiterverdünnt und zunächst 10 min bei 600 x g in der Laborzentrifuge zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden bei verschiedenen Beschleunigungsgraden weiterzentrifugiert (Kühlzentrifuge Typ UNIVERSAL JUNIOR III KS der Fa. CHRIST). Die in den jeweiligen Überständen verbliebenen Phosphataseaktivitäten und Proteinkonzentrationen wurden gemessen. Bei allen Manipulationen wurde größtes Gewicht auf Verhinderung einer Erwärmung des Homogenates gelegt. So wurden die verwendeten Zentrifugengläser und die Saccharoselösung bis unmittelbar vor Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Da die Laborzentrifuge keine Kühlmöglichkeit besitzt, wurden die Aluminium-

einsätze vor Benutzung in der Tiefkühltruhe auf ca. -18°C abgekühlt. Die Enzymbestimmungen erfolgten (ohne zwischenzeitliches Einfrieren) unmittelbar nach Erhalt der Überstände.

3.7. Untersuchungen zur Wirkung von Folsäure auf die Mäuseniere

3.7.1. Dosis- und Zeitabhängigkeit

Gruppen von je 5 Mäusen wurde Folsäure in Dosen von 60, 120 und 180 mg/kg Körpergewicht injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten die entsprechende Menge 0,3 M Na-bikarbonat. Nach 4, 6, 8, 12, 16, 24 Stunden und 2, 4, 6, 8, 14 und 21 Tagen wurden die Tiere aufgearbeitet, und das relative Organgewicht bestimmt. Die Homogenate wurden eingefroren und am nächsten Tage den Enzym- und Proteinbestimmungen unterzogen.

3.7.2. Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Niere in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt

Gruppen von je 5 Mäusen wurde Folsäure in einer Dosis von 120 mg/kg, den Kontrollen Na-bikarbonat-Lösung i.v. injiziert. Die Tiere wurden 3, 6 und 24 Stunden und 2, 4, 8 und 14 Tage später aufgearbeitet, und die Homogenate 40 min bei 12500 x g in der Kühlzentrifuge geschleudert. Die Enzymbestimmungen aus den Überständen erfolgten direkt anschließend.

3.7.3. Zur Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Niere unter dem Einfluß von Ultraschall

Gruppen von je 5 Mäusen wurden Folsäure in Dosen von 60, 120 und 180 mg bzw. Na-bikarbonat appliziert. 48 Stunden p.i. wurden die Tiere aufgearbeitet. Je 10 ml der Nierenhomogenate wurden je 3 min mit dem Ultraschall Desintegrator SONIFIER Typ S 125 (HF-Generator, Schallkopf und Schallrüssel 1/2, BRANSONS INSTRUMENTS, New York) bei Energiestufe 8 beschallt. Die Beschallung erfolgte unter Eiswasserkühlung, die Schichtdicke

des Homogenates betrug ca. 3,5 cm. Anschließend wurden die Homogenate 40 min bei 12500 x g zentrifugiert und die Phosphataseaktivitäten der Überstände bestimmt.

3.8. Sedimentierbarkeit von Phosphatasen, DNasen und Glutamat-Dehydrogenase der Mäuseniere vergleichend

Ein im Verhältnis 1 : 50 verdünntes Nierenhomogenat wurde 10 min bei 600 x g, der Überstand weitere 20 min bei 8000 x g zentrifugiert. Das Vollhomogenat und der 600 x g-Überstand wurden eingefroren. Der bei 8000 x g erhaltene Überstand wurde nicht dekantiert, sondern in dem verwendeten Nitrozellulose-Zentrifugenglas belassen und in diesem eingefroren. Letzteres wurde dann in der halben Einfüllhöhe zerschnitten. Vom Vollhomogenat, dem 600 x g-Überstand und der oberen Hälfte des 8000 x g-Überstandes wurden die Aktivitäten von Saurer und Alkalischer Phosphatase, der DNasen I und II, sowie der Glutamat-Dehydrogenase bestimmt.

3.8.1. Bestimmung der Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase

3.8.1.1. Prinzip

Die GLDH katalysiert die Reaktion:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NADH \longrightarrow \text{Glutamat} + NAD^+ + H_2O$$

Die Abnahme von NADH im Ansatz kann im UV-Bereich spektrophotometrisch gemessen werden. Der NADH-Verlust pro Zeiteinheit ist der GLDH-Aktivität proportional.

3.8.1.2. Lösungen

Die Bestimmung erfolgte mit der Biochemica-Test-Combination GLDH (Fa. BOEHRINGER MANNHEIM GmbH). Diese beinhaltet:

Lösung 1: 50 mM Triäthanolaminpuffer, pH = 8,0;
4 mM Äthylendiamintetraacetat

Lösung 2: 3,2 M Ammoniumacetat

Lösung 3: 12 mM NADH

Lösung 4: 0,41 M α-Ketoglutarat

3.8.1.3. Ausführung

2 ml der "Lösung 1" wurden mit 1 ml des im Verhältnis 1 : 1000 verdünnten Homogenats versetzt. Anschließend wurden 0,1 ml "Lösung 2" und 0,05 ml "Lösung 3" zugegeben. Nach Durchmischung wurde 20 min bei 25 °C inkubiert und die Extinktion E_1 in einer 1 cm-Quarzküvette bei 334 mμ gegen Luft spektrophotometriert. Nach erneuter 10 min. Inkubation bei 25°C wurde wieder gemessen (E_2). Nun wurden noch 0,05 ml der "Lösung 4" zugefügt, gemischt, und die Extinktion E_3 gemessen. Nach weiterer 10 min. Inkubation erfolgte die Messung von E_4:

$$\Delta E = (E_3 - E_4) - (E_1 - E_2)$$

3.8.2. Bestimmung der Aktivität der DNase I

3.8.2.1. Prinzip

Enzymatisch freigesetzte, in TCE gelöste DNS-Abbauprodukte können durch spektrophotometrische Messung im UV-Bereich bestimmt werden.

3.8.2.2. Lösungen

Tris-HCl-Puffer: 25 ml einer wäßrigen Lösung von 0,2 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (3.1.24.) wurden bei 30°C mit 0,1 N HCl (3.1.21.) auf einen pH-Wert von 7,9 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

DNS-Lösung: Die DNS wurde durch ca. 60 min. automatisches Rühren (Laborrührer Typ RZR, Fa.H.HEIDOLPH, Schwabach) zu 0,5 % in dest. Wasser gelöst und in Portionen von 5 ml eingefroren.

$MgCl_2$-Lösung (3.1.15.) : 0,0468 M in dest. Wasser

TCE-Lösung (3.1.23.) : 3,6 M in dest. Wasser

3.8.2.3. Ausführung

0,5 ml des 1 : 50 verdünnten Nierenhomogenats wurden mit 2,0 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,9) und 0,5 ml einer mit 0,0468 M $MgCl_2$-Lösung im Verhältnis 1 : 2 verdünnten wäßrigen, 0,25 %igen DNS-Lösung 90 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,8 ml einer 3,6 M wäßrigen TCE-Lösung abgestoppt. Nach 20 min. Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe wurden die Proben 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert. 1 ml jeden Überstandes wurde mit 10 ml Aqua dest. versetzt und sorgfältig gemischt. Die Proben wurden in 1 cm-Quarzküvetten bei 260 m/u gemessen. Als Vergleich (100 %ige Durchlässigkeit) diente eine Mischung aus 1 ml "TCE - Aqua dest." und 10 ml Aqua dest. Die Lösung "TCE - Aqua dest." bestand aus 3,0 ml Aqua dest. und 0,8 ml 3,6 M TCE. Die Differenz zwischen Probe und "Blindwert" (Zusatz des Substrats erst nach Beendigung der Reaktion durch TCE) ist ein Maß für freigesetzte DNS-Abbauprodukte.

3.8.3. Bestimmung der Aktivität der DNase II

3.8.3.1. Prinzip: s.: 3.8.2.1.

3.8.3.2. Ausführung

Die Bestimmung erfolgte analog der DNase I-Bestimmung, wobei an Stelle des Tris-HCl-Puffers ein Natriumacetat-Puffer (3.3.2.) mit pH 5,0 Verwendung fand. Der DNase II-Ansatz enthielt keine sonstigen Ionenzusätze.

3.9. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse

Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert einer Versuchsreihe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Erläuterung der Indices:

s_x = Standardabweichung

x_i = Einzelwert einer Stichprobe

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Stichproben

n = Anzahl der Stichproben einer Versuchsreihe

Die Signifikanzanalyse erfolgte nach dem " t-Test " (30).

3.10. Toxizitätsprüfung

Zur Bestimmung der DL_{50} wurde 10er-Gruppen von männlichen und weiblichen Mäusen Folsäure in arithmetisch ansteigenden Dosen appliziert. Die Auswertung erfolgte nach drei gängigen Methoden vergleichend an insgesamt 210 Tieren.

3.10.1. Methode nach KÄRBER (155)

Als mittlere tödliche Dosis wird der Wert angenommen, von welchem aus die Summe der negativen und positiven Abweichungen gleich ist (arithmetisches Mittel). Die Bestimmung der DL_{50} erfolgt nach folgender Formel:

$$aM = Dm - \frac{\sum(z \cdot d)}{m}$$

Erläuterung der Indices:

aM = arithmetisches Mittel (= DL_{50})

Dm = maximale Dosis, bei der alle Tiere reagieren

z = die halbe Summe der positiv reagierenden Tiere von je zwei aufeinanderfolgenden Dosen

d = Differenz der Zahlenwerte zweier aufeinanderfolgender Dosen

m = Anzahl der Tiere in jeder Gruppe

3.10.2. Methode nach BEHRENS (ibid.)

Aus der beobachteten Mortalität wird die sog. " abgeleitete Sterblichkeit " ermittelt. Hierbei wird zum Zähler der in Form eines Bruches ausgedrückten beobachteten Sterblichkeit jeweils die Anzahl aller bei niedereren Dosen gestorbenen und zum Nenner die Anzahl aller bei höheren Dosen überlebender Tiere addiert. Als " Zentralwert " (DL_{50}) gilt die Dosis, der eine abgeleitete Sterblichkeit entsprechend 1/2 zugeordnet ist.

3.10.3. Probit-Analyse (30)

Die Transformation der prozentualen Häufigkeit in Probits (probability units) ermöglicht es, die sich bei der graphischen Darstellung von Dosiswirkungsbeziehungen meist ergebenden, sigmoiden Kurven als Gerade darzustellen. Jeder prozentualen Häufigkeit ist ein Probit zugeordnet und umgekehrt. Die Probits leiten sich von den k-Werten des Wahrscheinlichkeitsintegrals ab. Um nicht mit negativen Werten arbeiten zu müssen, ist zu jedem k-Wert die Zahl 5 addiert.

Ausführung:

Die prozentuale Häufigkeit wurde aus der nach BEHRENS abgeleiteten Sterblichkeit ermittelt.

1.) Entnahme der empirischen Probits (Y_e) aus einer Probit-Tabelle (z.B. 59)
2.) Graphische Darstellung der empirischen Probits als Funktion der Dosis
3.) Zeichnung einer provisorischen Probitgeraden unter bestmöglicher Angleichung an die Punkteschar
4.) Ablesung der den Dosen zugeordneten provisorischen Probits (Y_p) aus der provisorischen Probitgeraden
5.) Ermittlung der Rechenprobits (Y_b):

$$Y_b = Y_{b\ min} + Pe\ I \quad (\text{für } Y_p = 6{,}9)$$

$$Y_b = Y_{b\ max} - (1 - Pe)\ I \quad (\text{für } Y_p \ 6{,}9)$$

($Y_{b\ min}$, $Y_{b\ max}$, Pe und I sind tabelliert, z.B. bei l.c.30)

6.) Bestimmung der DL_{50} nach folgender Formel:

$$DL_{50} = 5 - \frac{\sum(n \cdot w \cdot Y_b) - \frac{\sum(n \cdot w \cdot Y_b) \cdot \sum(n \cdot w \cdot d)}{\sum(n \cdot w)}}{\sum(n \cdot w \cdot Y_b) - \frac{\sum(n \cdot w \cdot Y_b) \cdot \sum(n \cdot w \cdot D)}{\sum(n \cdot w)}} \cdot \sum(n \cdot w \cdot D)$$

$$\cdot \sum(n \cdot w \cdot D^2) - \frac{\left[\sum (n \cdot w \cdot D)\right]^2}{\sum(n \cdot w)}$$

Erläuterung der Indices:

w = Gewicht des Probits (tabelliert)

D = Folsäuredosis in mg/kg

sonst siehe S. 32

4. ERGEBNISSE

4.1. Zur Toxizität der Folsäure

4.1.1. Männliche Mäuse

4.1.1.1. Methode nach KÄRBER

Unter Zugrundelegung des KÄRBER'schen Berechnungsschemas ergab sich für männlichen Mäusen intravenös applizierte Folsäure eine DL_{50} von 259,5 mg/kg K.-Gew..

Tab. 3: Absterberate (+) männlicher Mäuse nach unterschiedlichen Folsäuredosen (in mg/kg K.-Gew.)

Zur Erklärung der Indices s. 3.10.1.

Folsäure-Dosis	Reaktion	z	d	z d
540	+ + + + + + + + + +			
480	+ + + + + + + + + -	9,5	60	570
420	+ + + + + + + + - -	8,5	60	510
360	+ + + + + + + - - -	7,5	60	450
300	+ + + + + + + - - -	7,0	60	420
270	+ + + + + + + - - -	7,0	30	210
240	+ + + + - - - - - -	5,5	30	165
210	+ + + + - - - - - -	4,0	30	120
180	+ + + + + - - - - -	4,5	30	135
150	+ + + - - - - - - -	4,0	30	120
120	+ - - - - - - - - -	2,0	30	60
90	+ - - - - - - - - -	1,0	30	30
60	- - - - - - - - - -	0,5	30	15

4.1.1.2. Methode nach BEHRENS

Der Zentralwert der abgeleiteten Sterblichkeit lag für männliche Mäuse bei einer Folsäuredosis von 240 mg/kg K.-Gew..

Tab. 4: Abgeleitete Sterblichkeit männlicher Mäuse nach unterschiedlichen Folsäuredosen

Folsäure-Dosis	Überlebende	Tote	Beob. Sterbl.	Abgel. Sterbl.
60	10	--	--	--
90	9	1	1/10	1/55
120	9	1	1/10	2/47
150	7	3	3/10	5/41
180	5	5	5/10	10/39
210	6	4	4/10	14/38
240	6	4	4/10	18/36
270	3	7	7/10	25/37
300	3	7	7/10	32/41
360	3	7	7/10	39/45
420	2	8	8/10	47/50
480	1	9	9/10	56/57
540	--	10	10/10	66/66

4.1.1.3. Probit-Analyse

Die nach dieser Methode berechnete DL_{50} für männliche Mäuse entsprach einer Folsäuredosis von 247,2 mg/kg K.-Gew..

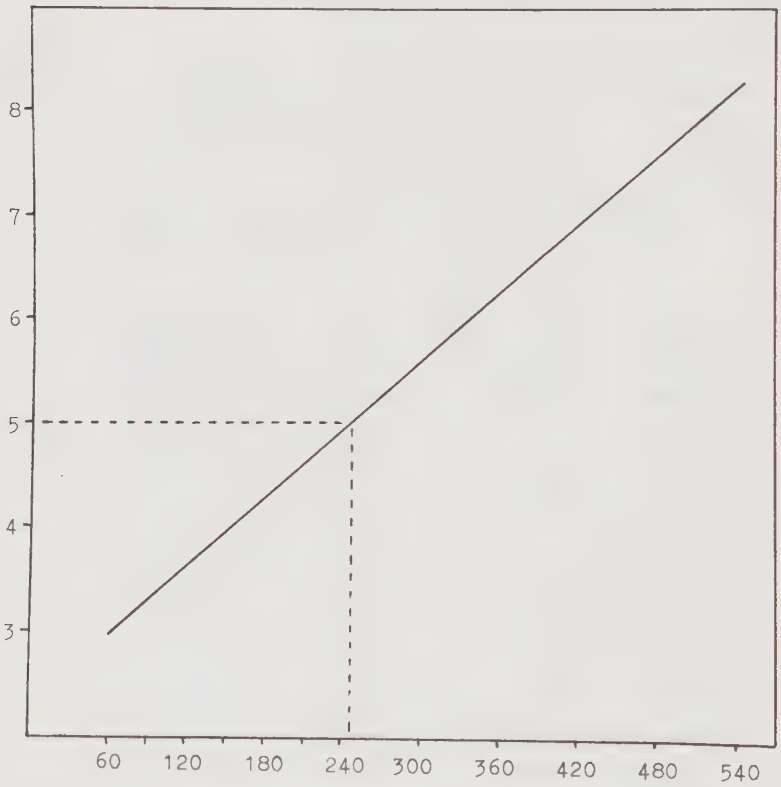


Abb. 1: Probitgerade der abgeleiteten Sterblichkeit
======= männlicher Mäuse nach Folsäurebelastung.

Abszisse: Folsäuredosen in mg/kg K.-Gew.

Ordinate: Probits

4.1.2. Weibliche Mäuse

4.1.2.1. Methode nach KÄRBER

Die DL_{50} von Folsäure für weibliche Mäuse lag bei 183 mg/kg K.-Gew..

Tab. 5 : Absterberate (+) weiblicher Mäuse nach unterschiedlichen Folsäuredosen (in mg/kg K.-Gew.)

Zur Erklärung der Indices s. 3.10.1.

Folsäure-Dosis	Reaktion	z	d	z d
270	+ + + + + + + + + +			
240	+ + + + + + + + + -	8,5	30	255
210	+ + + + + + - - - -	6,5	30	195
180	+ + + + + + - - - -	6,0	30	180
150	+ + - - - - - - - -	4,0	30	120
120	+ + - - - - - - - -	2,0	30	60
90	+ - - - - - - - - -	1,5	30	45
60	- - - - - - - - - -	0,5	30	15

4.1.2.2. Methode nach BEHRENS

Der Zentralwert der abgeleiteten Sterblichkeit lag für weibliche Mäuse bei einer Folsäuredosis von 180 mg/kg K.-Gew..

Tab. 6 : Abgeleitete Sterblichkeit weiblicher Mäuse nach unterschiedlichen Folsäuredosen.

Folsäure-Dosis	Überlebende	Tote	Beob. Sterbl.	Abgel. Sterbl.
60	10	--	--	--
90	9	1	1/10	1/37
120	8	2	2/10	3/30
150	8	2	2/10	5/24
180	4	6	6/10	11/22
210	4	6	6/10	17/24
240	3	7	7/10	24/27
270	--	10	10/10	34/34

4.1.2.3. Probit-Analyse

Für die Folsäurewirkung auf weibliche Mäuse errechnete sich eine DL_{50} von 175,3 mg/kg K.-Gew.

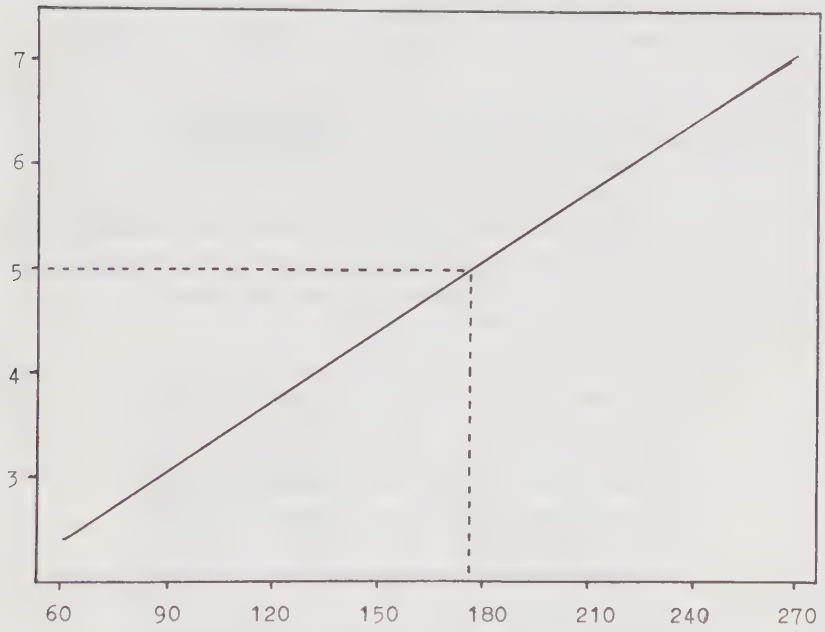


Abb. 2 : Probitgerade der abgeleiteten Sterblichkeit weiblicher Mäuse nach Folsäurebelastung.

Abszisse: Folsäuredosen in mg/kg K.-Gew.

Ordinate: Probits

4.2. Kontrollwerte

Die im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung von Folsäure in Dosis- und Zeitabhängigkeit an weiblichen Mäusen ermittelten Vergleichswerte für Körper- und Nierengewicht, Phosphataseaktivität und Proteingehalt der Niere sind in Tab.7 zusammengestellt. Die Versuchsgruppen wurden selbstverständlich unter zeitlich und methodisch identischen Bedingungen wie die Kontrollgruppen gehalten und verwertet.

Tab. 7 : Phosphatasen und Protein der Niere, Nieren- und Körpergewicht von Kontrollmäusen

Spalte I : Aktivität der Sauren Phosphatase in ImU/mg Nierenfrischgewicht

Spalte II : Aktivität der Alkalischen Phosphatase in ImU/mg

Spalte III : Proteingehalt in mg/g Nierenfrischgewicht

Spalte IV : Nierenfrischgewicht in mg (pro Paar)

Spalte V : Körpergewicht in g

	I	II	III	IV	V
$\bar{x}$	10,5	90,4	255	195	20,0
$Sx\pm$	1,2	8,6	23,6	27,0	1,82
n	72	72	54	90	90

4.3. Reaktionsbedingungen der Sauren Phosphatase

4.3.1. pH-Optimum

In Natriumacetat-Puffer zeigte die Saure Phosphatase der Mäuseniere bei einem pH-Wert von 5,2 maximale Aktivität (Abb.3). Abweichungen vom pH-Optimum um 0,2 blieben ohne signifikanten Einfluß (Tab.8).

Tab.8 : Spaltung von p-NPP an Saurer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit vom pH-Wert der Ansätze

Zeile A : pH-Wert des Ansatzes

Zeile $\bar{x}$: Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der im pH-Optimum erhaltenen Werte

A	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0
$\bar{x}$	86	97	100	98	87	86	55
Sx	± 1,8	± 3,0	± 3,2	± 2,6	± 3,7	± 2,0	± 3,7
t	11,2	2,0	——	1,0	7,0	9,1	22,3
p	<0,001	>0,05	——	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001
n	5	5	5	5	5	5	5

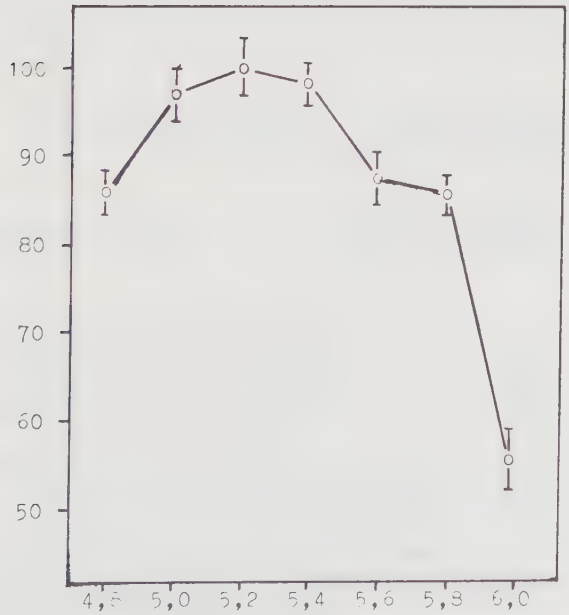


Abb. 3 : Legende s.nächste Seite

Abb. 3 : p-NPP-Abbau an Saurer Phosphatase in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Abszisse : pH-Wert der Ansätze

Ordinate : Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der im pH-Optimum erhaltenen Werte.

4.3.2. Ionen-Optimum, Kofaktoren, Inhibitoren

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauren Phosphatase zeigte im pH-Optimum keine Abhängigkeit von den gewählten Natriumacetat-Konzentrationen der Ansätze. Die Abbaurate war bei Molaritäten von 0,152, 0,076 und 0,038 M praktisch gleich. Bei Zusatz von $MgCl_2$ bzw. $ZnSO_4$ in Molaritäten von je 1 mM und 5 mM im Ansatz konnte durch $MgCl_2$ in beiden Konzentrationen keine signifikante Aktivitätserhöhung bewirkt werden, während 5 mM $ZnSO_4$ die Aktivität um 8% steigerten. Der Zusatz von 1 mM Tartat pro Ansatz verlangsamte die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauren Phosphatase um 30%. Eine Erhöhung der Tartratkonzentration auf 5 mM bewirkte keine verstärkte Hemmung.

Tab. 9 : Beeinflussung des p-NPP-Abbaus an Saurer Phosphatase der Mäuseniere durch $ZnSO_4$, $MgCl_2$ und Tartrat

Zeile A : Molarität der Ansätze

Zeile $\bar{x}$: Umsatz in Prozent der im reinen Acetatpuffer gemessenen Werte

	$ZnSO_4$		$MgCl_2$		Tartrat	
A	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
$\bar{x}$	100	108	101	101	71	70
Sx	± 2,5	± 2,7	± 4,0	± 2,8	± 1,8	± 1,6
t	--	5,4	0,5	0,3	19,6	18,9
p	--	<0,01	>0,5	>0,5	<0,001	<0,001
n	5	5	5	5	5	5

4.3.3. Substratkonzentration

Aus der Geschwindigkeit des Abbaus von p-NPP an Saurer Phosphatase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergab sich nach LINEWEAVER-BURK eine MICHAELIS-Konstante K_m von $8{,}49 \times 10^{-3}$ M.

Tab. 10 : p-NPP-Spaltung an Saurer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Zeile A : mg Substrat pro Ansatz

Zeile $\bar{x}$: mittlere Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der bei einer Substratkonzentration von 1 mg/Ansatz gemessenen Werte

A	2	1	0,5	0,25
$\bar{x}$	118	100	78	62
Sx	± 4,0	± 2,3	± 1,6	± 2,9
n	5	5	5	5

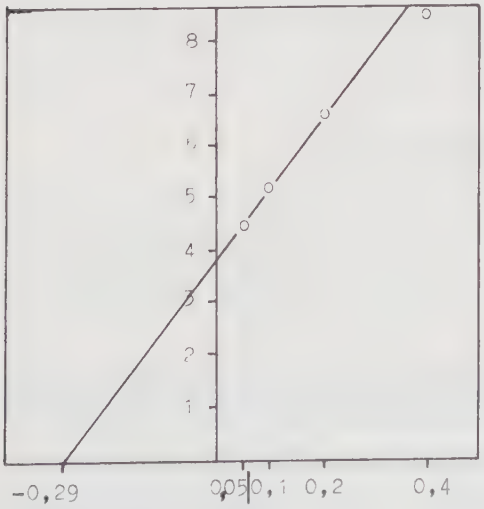


Abb. 4 : Legende s.nächste Seite

Abb. 4 : p-NPP-Spaltung an Saurer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach LINEWEAVER-BURK

Abszisse : Reziproke Werte der Substratkonzentration (in mg/l ml Ansatz)

Ordinate : Reziproke Werte der Umsatzrate (in ΔE/30 min)

4.3.4. Inkubationszeit

Bei 30°C erfolgte der Abbau von p-NPP an Saurer Phosphatase der Mäuseniere von 15 bis 60 min direkt zeitproportional (Tab.11).

Tab.11 : p-NPP-Umsatz in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Zeile A : Inkubationszeit in Minuten

Zeile $\bar{x}$: mittlerer Substratumsatz in Prozent des 30 min-Wertes

A	15	30	45	60
$\bar{x}$	50	100	153	200
Sx	$\pm$ 1,9	$\pm$ 2,4	$\pm$ 4,9	$\pm$ 7,4
n	5	5	5	5

4.3.5. Enzymkonzentration

Unter den gewählten Bedingungen verhielt sich die Geschwindigkeit des p-NPP-Umsatzes an Saurer Phosphatase zum Verdünnungsverhältnis des Mäusenierenhomogenates umgekehrt proportional (Tab.12).

Tab. 12 : Geschwindigkeit des p-NPP-Abbaus an Saurer Phosphatase der Niere der Maus in Abhängigkeit von der Homogenatkonzentration der Ansätze

Zeile A : Verdünnungsverhältnis des Homogenats

Zeile $\bar{x}$: Mittlerer Substratumsatz in Prozent der bei einer Verdünnung von 1 : 200 gemessenen Werte

Tab. 12
=======

A	1:400	1:200	1:100	1:50
$\bar{x}$	45	100	250	518
Sx	± 3,2	± 5,0	± 8,5	±10,3
n	5	5	5	5

4.3.6. Inkubationstemperatur

Die Spaltung von p-NPP durch Nierenhomogenat der Maus bei pH 5,2 zeigte deutliche Temperaturabhängigkeit (Tab.13,Abb.5). Bei 30 min. Inkubation erhöhte sich die Aktivität der Sauren Phosphatase pro Grad Temperaturerhöhung im Bereich zwischen 22°C und 30°C um durchschnittlich 3% und im Bereich von 3o°C bis 35°C im Mittel um 10%. Gegen 4o°C zeigte sich dann eine deutliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

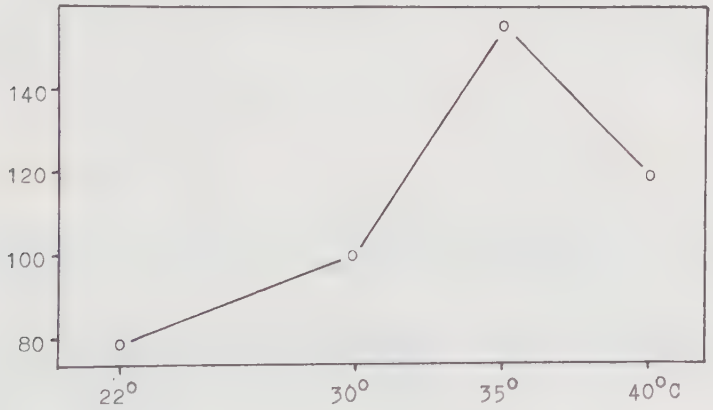


Abb. 5 : p-NPP-Umsatz an Saurer Phosphatase in Abhängigkeit von der Temperatur
======

Abszisse : Temperatur der Ansätze in Grad Celsius

Ordinate : Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der Umsatzrate bei 30°C

Tab. 13 : p-NPP-Abbau an Saurer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Temperatur

Zeile A : Inkubationstemperatur in Grad Celsius

Zeile $\bar{x}$: Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der Umsatzrate bei 30°C

A	22	30	35	40
$\bar{x}$	79	100	155	128
Sx	± 3,6	± 3,2	± 2,6	± 1,9
n	5	5	5	5

4.4. Reaktionsbedingungen der Alkalischen Phosphatase

4.4.1. pH-Optimum

In Glycin-NaOH-Puffer hatte die Alkalische Phosphatase der Mäuseniere bei einem pH-Wert von 10,25 die höchste Aktivität. Abweichungen von ± 0,1 vom optimalen pH-Wert verringerten die Reaktionsgeschwindigkeit um weniger als 10% (aber signifikant). (Tab.14, Abb.6)

Tab. 14 : pH-Optimum der Alkalischen Phosphatase der Mäuseniere

Zeile A : pH-Werte der Ansätze

Zeile $\bar{x}$: mittlere Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase in Prozent der im Maximum gemessenen Werte

A	9,75	10,0	10,15	10,25	10,35	10,50	10,75
$\bar{x}$	70	88	93	100	97	92	74
Sx	± 2,7	± 1,4	± 1,3	± 2,8	± 1,6	± 1,4	± 1,8
t	22,7	10,2	7,8	- -	3,0	6,6	21,3
p	<0,001	<0,001	<0,01	- -	<0,05	<0,001	<0,001
n	10	10	4	10	4	10	10

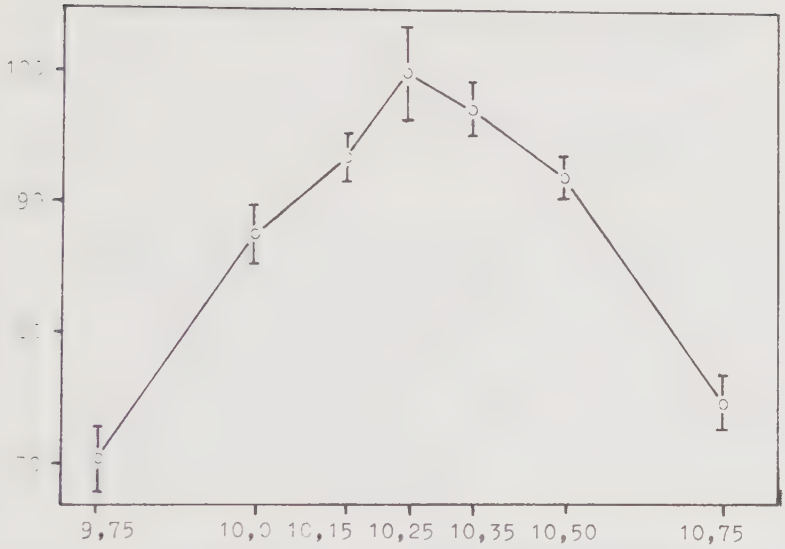


Abb. 6 : pH-Optimum der Alkalischen Phosphatase aus Mäusenierenhomogenat

Abszisse : pH-Werte der Ansätze

Ordinate : Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent des Maximalwertes

4.4.2. Ionen-Optimum

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase der Mäuseniere war unter den gewählten Bedingungen bei einer $MgCl_2$-Konzentration von 2 mM/Ansatz maximal. Verringerung bis zu einem 1/16 der optimalen Konzentration führte jedoch nur zu unwesentlichen (wenn auch signifikanten) Aktivitätsverlusten (Tab.15).

Tab. 15 : Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit vom $MgCl_2$-Zusatz

Zeile A : Molare $MgCl_2$-Konzentration der Ansätze

Zeile $\bar{x}$: Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent des Maximalwertes

A	0,004	0,002	0,001	0,0005	0,00025	0,000125
$\bar{x}$	98	100	99	96	96	91
Sx	± 1,2	± 1,5	± 0,8	± 1,0	± 1,3	± 1,7
t	2,4	--	1,0	4,6	4,2	9,0
p	>0,05	--	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01
n	5	5	5	5	5	5

4.4.3. Substratkonzentration

Aus der Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Tab.16) ließ sich nach LINEWEAVER-BURK eine MICHAELIS-Konstante K_m von $1{,}06 \times 10^{-2}$ M ableiten (Abb.7).

Tab. 16 : Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Zeile A : Substratkonzentration in mg/Ansatz

Zeile $\bar{x}$: Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent des bei einer p-NPP-Konzentration von 1 mg/Ansatz gemessenen Wertes

A	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0
$\bar{x}$	56	74	100	119	123
Sx	± 1,7	± 2,1	± 2,3	± 1,4	± 2,3
n	5	5	5	5	5

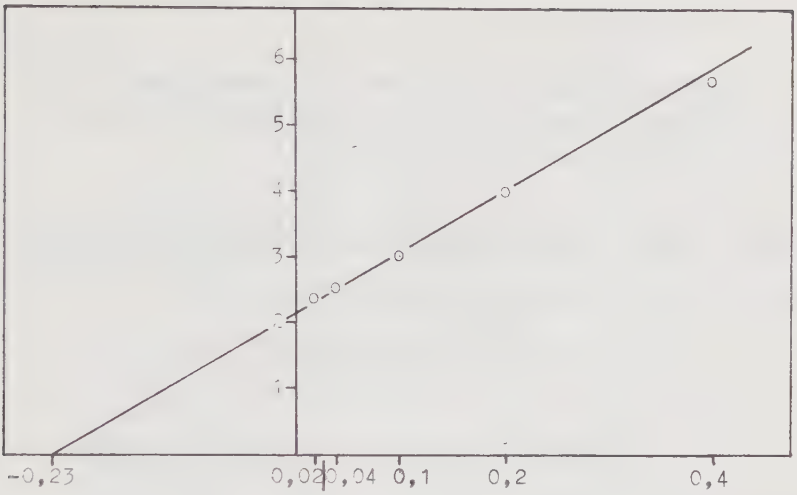


Abb. 7 : p-NPP-Abbau an Alkalischer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach LINEWEAVER-BURK

Abszisse : Reziproke Werte der Substratkonzentration (in mg/Ans.)

Ordinate : Reziproke Werte der Reaktionsgeschwindigkeit (in ΔE pro 30 min)

4.4.4. Inkubationszeit

Die p-NPP-Spaltung an Nierenhomogenat im alkalischen Bereich erfolgte mindestens 60 min lang zeitproportional (Tab.17).

Tab. 17 : p-NPP-Abbau an Alkalischer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Zeile A : Inkubationszeit in Minuten

Zeile $\bar{x}$: Substratumsatz in Prozent des 30 min-Wertes

A	15	30	45	60
$\bar{x}$	51	100	150	196
Sx	$\pm$ 1,6	$\pm$ 1,9	$\pm$ 1,5	$\pm$ 1,1
n	5	5	5	5

4.4.5. Enzymkonzentration

Bei Homogenatsverdünnungen von 1:125 bis 1:2000 verhielt sich der Umfang des Abbaues von p-NPP an Alkalischer Phosphatase zur Enzymkonzentration direkt proportional.

Tab. 18 : p-NPP-Umsatz an Alkalischer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Zeile A : Verdünnungsverhältnis des Homogenats

Zeile $\bar{x}$: Substratumsatz in Prozent des bei einer Homogenatsverdünnung von 1:500 gemessenen Wertes

A	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000
$\bar{x}$	413	203	100	48	25
Sx	$\pm$ 3,7	$\pm$ 4,8	$\pm$ 1,1	$\pm$ 0,8	$\pm$ 0,4
n	5	5	5	5	5

4.4.6. Inkubationstemperatur

Unter den Bedingungen des Versuchs war der p-NPP-Abbau an Alkalischer Phosphatase der Mäuseniere bei 35°C maximal. Im Temperaturbereich von 22°C bis 35°C ergab sich ein praktisch linearer Anstieg von ca. 7% pro Grad Temperaturerhöhung. Steigerung der Temperatur auf 40°C führte zu einer 9%igen Aktivitätseinbuße (Tab.19, Abb.8).

Tab. 19 : p-NPP-Abbau an Alkalischer Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Temperatur

Zeile A : Inkubationstemperatur in Grad Celsius

Zeile $\bar{x}$: Reaktionsgeschwindigkeit in Prozent der bei 30°C gemessenen Werte

Tab. 19
=======

A	22	25	30	35	40
$\bar{x}$	56	78	100	119	109
Sx	± 2,5	± 1,6	± 1,5	± 0,6	± 2,4
n	5	5	5	5	5

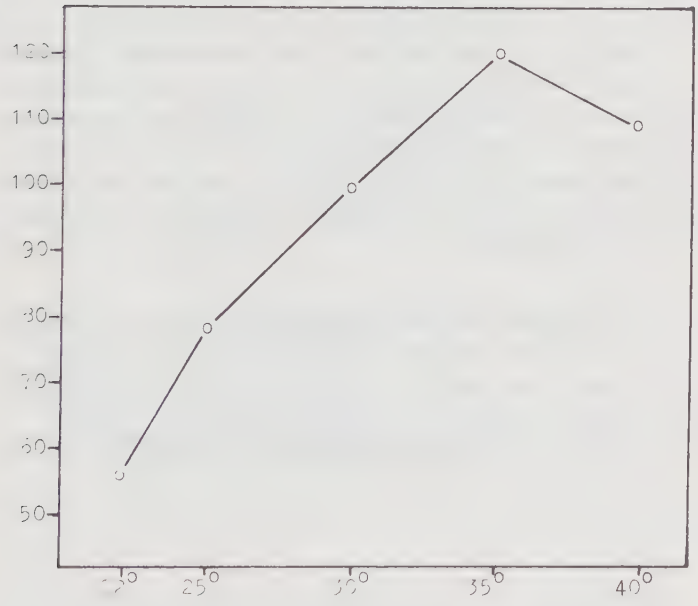


Abb. 8 : Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Mäuseniere in Abhängigkeit von der Temperatur
=======

Abszisse : s.Zeile A von Tab.19

Ordinate : s.Zeile $\bar{x}$ von Tab.19

4.5. Zur Sedimentierbarkeit der Phosphatasen der Mäuseniere

4.5.1. Phosphataseaktivitäten bei differentieller Zentrifugation

Beide Phosphataseaktivitäten der Mäuseniere waren teilweise sedimentierbar: Wurde Vollhomogenat 20 min bei 500 x g zentrifugiert, ergab sich für die spezifische Aktivität beider Phosphatasen eine Steigerung von je rund 30%. Wurde der 500 x g-Überstand bei 1000 x g weiterzentrifugiert, erreichte die spezifische Aktivität der Sauren Phosphatase den Ausgangsdurchschnitt, während die der alkalischen Esterase noch deutlich erhöht war. Bei weiterer differentieller Zentrifugation fiel die spezifische Aktivität beider Phosphatasen kontinuierlich ab, wobei jedoch der Abfall bei der Alkalischen Phosphatase deutlich stärker war. Nach 20 min.Zentrifugation bei 25000 x g ergaben sich für die Sedimente Anreicherungsfaktoren+) von 1,5 (Saure Phosphatase) bzw.von 2,5 (Alkalische Phosphatase).

Tab. 20 : Verhalten von Phosphataseaktivitäten der Niere der Maus bei differentieller Zentrifugation

Zeile A : Beschleunigung in g bei 20 min. Zentrifugation

Zeile $\bar{x}$: Aktivitäten der jeweiligen Überstände in Prozent der Aktivitäten des Vollhomogenats

---

+) $\text{Anreicherungsfaktor} = \frac{\text{Spezifische Aktivität des jeweiligen Sediments}}{\text{Spezifische Aktivität des Vollhomogenats}}$

Tab. 20

Alkalische Phosphatase					
A	500	1000	8000	12500	25000
Bezug : G.E.+) Frischgewicht					
$\underline{x}$	82	70	51	41	15
Sx	± 13	± 10	± 6	± 4	± 4
n	2	2	3	3	3
Bezug : G.E. Protein					
$\bar{x}$	130	121	105	80	40
Sx	± 9	± 7	± 7	± 15	± 8
n	2	2	3	4	3
Saure Phosphatase					
Bezug: G.E. Frischgewicht					
$\bar{x}$	82	58	44	47	25
Sx	± 7	± 6	± 9	± 6	± 4
n	2	2	3	3	3
Bezug : G.E. Protein					
$\bar{x}$	131	93	95	90	66
Sx	± 2	± 13	± 3	± 7	± 8
n	2	2	3	3	3

Eine Erhöhung der Saccharosekonzentration des Suspensionsmediums von 0,25 M auf 0,50 M bewirkte (40 min.Zentrifugation bei 12500 x g) für die Aktivität beider Phosphatasen keine nennenswerte Verringerung ihrer Sedimentierbarkeit.

+) G.E. = Gewichtseinheit

4.5.2. Zum Einfluß der Intensität des Homogenisationsvorgangs

Die Bedeutung der Homogenisationsintensität ergab sich aus folgendem Versuch (bei welchem die Nieren männlicher Tiere verarbeitet wurden): 10 Nieren wurden in 0,25 M Saccharose (Verdünnungsverhältnis von 1:10 G/V) im POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator bei " Stufe 2 " und einer einmaligen Auf- und Abbewegung des Kolbens, die gleichstarke Vergleichsgruppe bei " Stufe 5 " und unter 5maliger Auf- und Abbewegung homogenisiert. Anschließend wurden beide Homogenate auf ein Verdünnungsverhältnis von 1:50 weiterverdünnt und bei 500, 12500 und 25000 x g zentrifugiert. Hierbei ergab sich für die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase eine im wesentlichen einheitlich um durchschnittlich 11% verstärkte Sedimentierbarkeit im schonender hergestellten Homogenat. Die spezifische Aktivität der Sauren Phosphatase hingegen sedimentierte bei 500 x g nach der schwachen Homogenisation um ca. 32% vermehrt, während sich die Sedimentation bei 25000 x g durch die Intensität des Homogenisationsvorganges unbeeinflußt zeigte (Tab.21).

Tab.21 Verhalten von Phosphatase-Aktivitäten der Niere der Maus bei differentieller Zentrifugation in Abhängigkeit von der Intensität des Homogenisationsvorganges. Werte in Prozent des Vollhomogenats.

Zeile A :Beschleunigung in g (20 min)

Zeilen 1 und 1a : Aktivität der Überstände aus schonend hergestelltem Homogenat

Zeilen 2 und 2a : Aktivität der Überstände bei intensiver Homogenisierung

Tab. 21

	Alkalische			Saure		
A	500	12500	25000	500	12500	25000
Bezug: G.E. Frischgewicht						
1	69	32	8	59	30	16
2	95	47	11	89	50	21
Bezug: G.E. Protein						
1a	116	88	27	98	81	57
2a	139	96	30	130	103	57

4.5.3. Zur Sedimentierbarkeit von Phosphataseaktivitäten der Niere in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung

Es wurden von 10 Nierenpaaren je 10 Nieren in einer Grundverdünnung von 1:10 bzw. 1:15 homogenisiert. Beide Homogenate wurden im Verhältnis 1:5 weiterverdünnt, so daß sich Endverdünnungen von 1:50 bzw. 1:75 ergaben, und je 40 min bei 12500 x g zentrifugiert. Es ergab sich für die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase im 1:75 verdünnten Homogenat gegenüber der Verdünnung von 1:50 eine um 22% erhöhte Sedimentierbarkeit, während die Saure Phosphatase um 10% vermehrt sedimentierte.

4.5.4. Versuche zur Differenzierung beider Phosphatasen im Sedimentationsverhalten

Um eine deutlichere Differenzierung beider Phosphatasen nach ihrem Sedimentationsverhalten zu erreichen, wurden die 12500 x g (20 min) Überstände in eine "obere" und eine "untere" Hälfte geteilt und die Aktivitäten beider Fraktionen einzeln bestimmt. Hierbei ergab sich insofern eine Differenzierung zwischen den beiden Enzymaktivitäten, als

die Restaktivität der Sauren Phosphatase in der oberen Überstandshälfte gegenüber jener der Alkalischen Phosphatase deutlicher vermindert war als in der unteren Hälfte (Tab.22).

Tab. 22 : Phosphataseaktivität in zwei Fraktionen des Überstandes von Nierenhomogenat nach 20 min. Zentrifugation bei 12500 x g (Zahlenangaben in Prozent der Werte des Vollhomogenats)

"Fraktion I" : Obere Hälfte des 12500 x g-Überstandes

"Fraktion II" : Untere Hälfte des 12500 x g-Überstandes

im übrigen s. Teil 3.8. der Methodik

Alkalische Phosphatase				
Bezug:	F.G.	Frischgewicht	F.G.	Protein
	I	II	I	II
$\bar{x}$	50	72	95	112
Sx	± 8	± 9	± 8	± 13
Saure Phosphatase				
$\bar{x}$	36	65	68	98
Sx	± 6	± 10	± 4	± 9
n	3	3	3	3

4.5.5. Sedimentierbarkeit von Phosphatasen und GLDH vergleichend ("Leitenzyme")

Die GLDH gilt als ausgesprochen mitochondriales Enzym. Aus dem Vergleich der Sedimentierbarkeit dieses Enzyms mit jener der beiden Phosphatase-Aktivitäten sollten Anhaltspunkte für Beziehungen der Phosphatase-Aktivitäten zur Mitochondrienfraktion gewonnen werden. In diese Untersuchungen wurden auch zwei DNasen mit einbezogen.

Soweit die gewählten Bedingungen überhaupt verläßliche Schlüsse zulassen, verhielten sich Saure Phosphatase, DNase II und GLDH einerseits und Alkalische Phosphatase und DNase I andererseits analog (Tab.23). Wurde zellkernfreies Nierenhomogenat bei 8000 x g zentrifugiert, verblieben in "Fraktion I" ("obere Hälfte") des Überstandes von der ersten Enzymgruppe 28 - 33 und von den Aktivitäten der beiden alkalischen Hydrolasen 38 - 4o%.

Tab. 23 : Aktivitäten von Phosphatasen, DNasen und GLDH im 600 x g-Überstand und in der "oberen Hälfte" des 8000 x g-Überstandes von Nierenhomogenat (n = 4 Bestimmungen)

Spalte I : Alkalische Phosphatase

Spalte II : Saure Phosphatase

Spalte III : DNase I

Spalte IV : DNase II

Spalte V : GLDH

Zeile 1 : Aktivität des 600 x g-Überstandes in Prozent der Aktivität des Vollhomogenats

Zeile 2 : Aktivität der "oberen Hälfte" des 8000 x g-Überstandes in Prozent der Aktivität des Vollhomogenats

	I	II	III	IV	V
1	89	77	95	88	100
2	40	30	38	28	33

4.5.6. Labilisierbarkeit der Phosphatasen der Niere der Maus

Die sogenannte "strukturelle Latenz" (vor allem für lysosomale Enzyme nachgewiesen ⟨41⟩) bedeutet, daß ein Teil der Enzymaktivität erst nach Membranlabilisierung der korpuskulären Trägermedien mit dem Substrat reagieren kann.
Um zu überprüfen, in welchem Maße Phosphatasen der Mäuseniere aus subzellulären Strukturen freigesetzt werden können, wurden die Einflüsse chemischer und physikalischer Noxen am Beispiel von Triton X 100 und Ultraschall auf das Homogenat untersucht.

Hierbei zeigte das mit Triton X 100 entsprechend einer Endkonzentration von 0,1% behandelte Homogenat deutlich verringerte Sedimentierbarkeit der spezifischen Aktivität beider Phosphatasen, während der Ultraschall-Effekt relativ schwach blieb (Tab.24,25).

Tab. 24 : Spezifische Phosphataseaktivität aus Überständen von mit Triton X 100 behandeltem Mäusenieren-Homogenat. Werte in Prozent der spezifischen Aktivität des Kontrollüberstandes

Zeile A : Beschleunigung in g bei 40 min.Zentrifugation

Spalte I : Alkalische Phosphatase

Spalte II : Saure Phosphatase

	I		II	
A	500	12500	500	12500
$\bar{x}$	100	197	109	162
Sx	± 2,4	± 12,3	± 4,8	± 10,2
n	3	3	3	3

Tab. 25 : Spezifische Aktivität von Phosphatasen aus Überständen von mit Ultraschall behandeltem Mäusenieren-Homogenat. Werte in Prozent der spezifischen Aktivität des unbehandelten Überstandes

Zeile A : Beschleunigung in g bei 40 min.Zentrifugation

Spalte I : Alkalische Phosphatase

Spalte II : Saure Phosphatase

	I		II	
A	500	12500	500	12500
$\bar{x}$	100	106	101	104
Sx	± 2,8	± 2,9	± 3,2	± 3,2
n	3	5	3	5

4.6. Zur Wirkung von Folsäure auf die Niere der Maus

4.6.1. Relatives Nierengewicht unter dem Einfluß von Folsäure

Die Applikation von Folsäure an der Maus führte zu einer massiven Vergrößerung der Nieren (Abb.9) mit Erhöhung des relativen Nierengewichtes. In Abhängigkeit von der Zeit p.i. ergab sich ein deutlich biphasischer Anstieg, wobei die erste Spitze von max. + 104% bereits 6 Stunden p.i. erreicht wurde. Auf den sich anschließenden Abfall mit Minimalwerten 24 bzw. 48 Stunden p.i. folgte ein erneuter Anstieg des relativen Organgewichts mit einer zweiten Spitze von max. + 137% am 4. Tag p.i.. Im weiteren Verlauf fiel das relative Nierengewicht wieder ab und lag nach 14 Tagen nur mehr unwesentlich über der Norm. Für den Zeitraum von 4 bis 16 Stunden konnte eine Dosisabhängigkeit nicht signifikant dargestellt werden, während der zweite Anstieg deutlich dosisabhängig war (Tab.27, Abb.10).

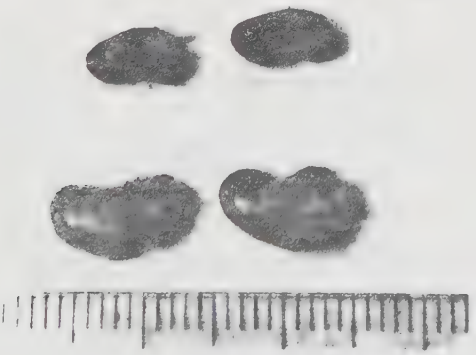


Abb. 9: Nierenvergrößerung 48 Std. nach Folsäureinjektion
(150 mg/kg K.-Gew.)

Oben : Kontrollnieren

Unten : Folsäure-Nieren

Tab. 26 : Entwicklung des relativen Nierengewichtes unter Folsäurebelastung in Zeit- und Dosisabhängigkeit

Zeile A : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung in Stunden

Spalte A : Folsäuredosis in mg/kg K.Gew.

Signifikante Differenzen zwischen den Dosiswerten

A		4^h	6^h	8^h	12^h	16^h	24^h
Kontrolltiere	$\bar{x}$	100	100	100	100	100	100
	Sx	±24,8	±14,3	±8,6	±4,2	±7,1	±8,3
	n	4	4	4	4	5	5
	t	2,0	13,0	5,2	4,7	2,6	2,1
	p	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	>0,05
60	$\bar{x}$	138	192	163	180	139	118
	Sx	±27,3	±14,3	±24,5	±34,2	±29,9	±18,5
	n	5	4	4	4	5	5
	t	0,1	0,8	0,6	0,3	1,4	1,0
	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
120	$\bar{x}$	139	186	160	186	172	140
	Sx	±10,0	±3,7	±28,1	±10,4	±43,3	±54,4
	n	5	4	4	4	5	5
	t	2,7	2,5	0,7	0,1	0,1	0,5
	p	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
180	$\bar{x}$	153	204	173	187	172	151
	Sx	±13,7	±14,2	±22,9	±36,6	±16,2	±41,4
	n	3	3	4	4	3	5

Tab. 27 : Entwicklung des relativen Nierengewichtes unter Folsäurebelastung in Zeit- und Dosisabhängigkeit

Zeile A : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung in Tagen

Spalte A : Folsäuredosis in mg/kg K.Gew.

Signifikante Differenzen zwischen den Dosiswerten

A		2^d	4^d	6^d	8^d	14^d	21^d
Kontrolltiere	$\bar{x}$	100	100	100	100	100	100
	Sx	±10,9	±16,2	±6,0	±5,7	18,2	8,2
	n	5	5	5	5	5	5
	t	1,8	1,9	1,3	1,7	0,5	1,0
	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
60	$\bar{x}$	114	132	125	109	95	105
	Sx	±15,2	±32,4	±42,2	±8,4	±8,1	±2,9
	n	5	5	5	5	5	3
	t	1,1	2,4	0,3	0,2	1,7	4,0
	p	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01
120	$\bar{x}$	123	184	132	108	112	127
	Sx	±8,7	±34,2	±19,4	±4,8	±21,6	±5,9
	n	4	5	4	5	4	3
	t	4,4	2,9	2,7	5,5	0,9	0,1
	p	<0,01	<0,05	<0,05	<0,001	>0,05	>0,05
180	$\bar{x}$	175	237	188	139	125	118
	Sx	±24,4	±21,8	±37,1	±23,2	±25,1	±2,3
	n	5	6	4	5	3	2

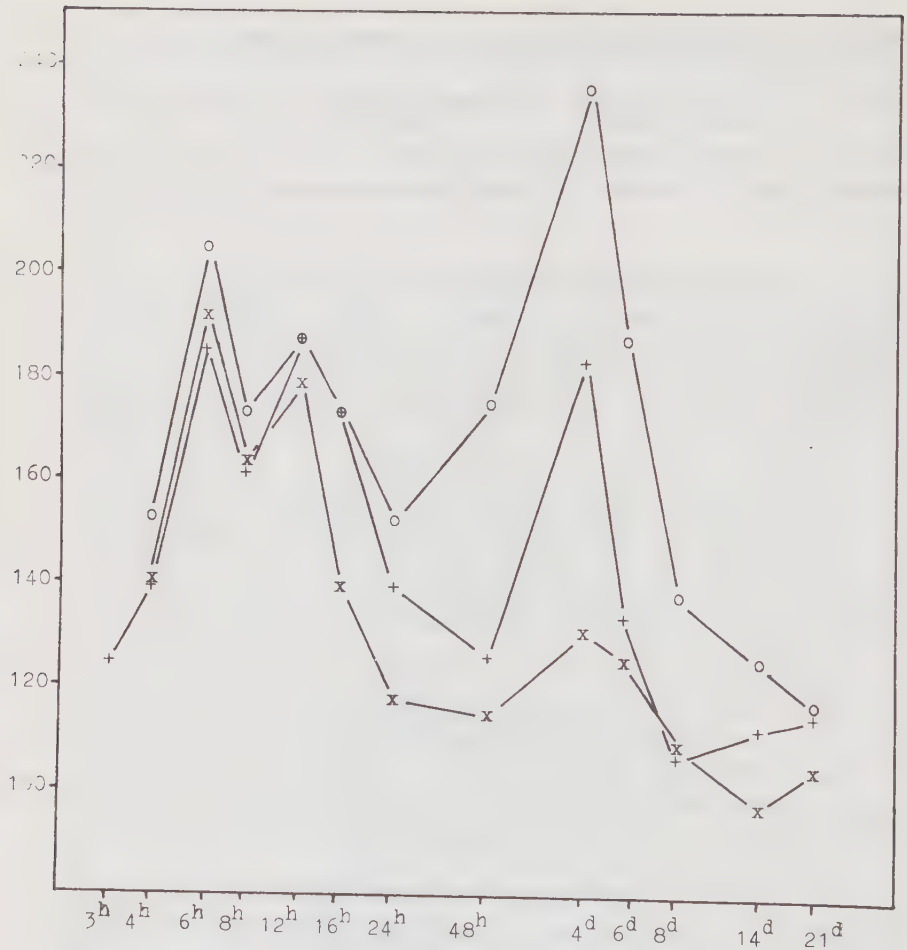


Abb. 10 : Entwicklung des relativen Nierengewichtes unter Folsäurebelastung

Abszisse : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung in Stunden (h) bzw. Tagen (d) in logarithmischer Darstellung

Ordinate : Relatives Organgewicht in Prozent der Kontrollwerte

x = 60 mg Folsäure/kg K.-Gew.
\+ = 120 mg Folsäure/kg K.-Gew.
o = 180 mg Folsäure/kg K.-Gew.

4.6.2. Proteingehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure

Der Proteingehalt der Nieren von folsäurebelasteten Mäusen verhielt sich zeitabhängig ähnlich wie das relative Organgewicht. 6 Stunden p.i. war bei einer Dosis von 180 mg/kg K.-Gew. eine Erhöhung des Proteingehalts um 11% zu verzeichnen. Nach einem Anstieg auf +14% nach 8 Stunden erfolgte bei der gleichen Dosis ein Abfall bis zum Kontrollwert, welcher nach 16 Stunden wieder erreicht wurde. Der am 2. Tag p.i.aufgetretene erneute Anstieg des Proteingehalts auf max. 153% verringerte sich im weiteren Verlauf kontinuierlich, so daß am 14. Tag p.i. Kontrollwerte gemessen wurden (Tab.28, Abb.11). Eine Dosisabhängigkeit für die einzelnen Zeitwerte konnte nicht gezeigt werden, da rund die Hälfte der für eine Folsäuredosis von 120 mg/kg K.-Gew. ermittelten Werte außerhalb des Trends lagen.

Tab. 28 : Protein-Gehalt der Nieren von mit Folsäure behandelten Mäusen in Abhängigkeit von Dosis und Versuchszeitpunkt (n = 3 Bestimmungen je Wert)

Zeile A : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung

Spalte A : Folsäuredosis in mg/kg K.-Gew.

Tab. 28:
========

Bezug: G.E.Frischgewicht												
A	4^h	6^h	8^h	12^h	16^h	24^h	2^d	4^d	6^d	8^d	14^d	21^d
60	77	55	63	62	69	96	78	83	82	88	98	96
120	68	53	68	57	54	89	80	61	77	84	86	81
180	64	53	68	53	60	72	69	61	64	73	78	86
Bezug: Gesamtorgan												
60	102	108	97	112	95	96	126	117	107	105	94	104
120	95	99	107	107	96	106	113	129	108	99	96	104
180	99	111	114	112	102	95	153	137	127	110	99	102

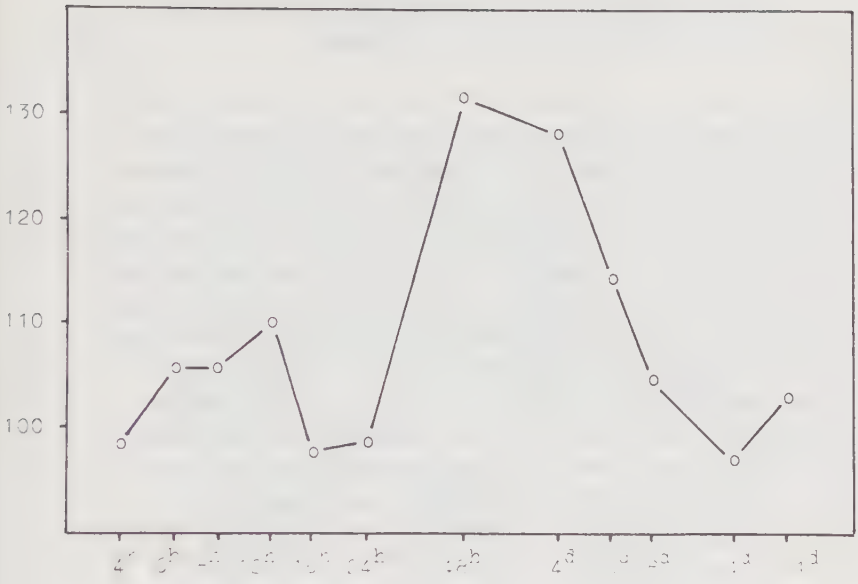


Abb. 11 : Entwicklung des Proteingehalts der Mäuseniere unter dem Einfluß von Folsäure

Abszisse : Zeit zwischen Injektion und Aufarbeitung in Stunden (h) bzw. Tagen (d) in logarithmischer Darstellung

Ordinate : Arithmetisches Mittel der nach der Applikation von Folsäure in Dosen von 60, 120 und 180 mg/kg K.-Gew. gemessenen Proteinwerte/G.E.Frischgewicht in Prozent der Kontrollwerte

4.6.3. Aktivität der Sauren Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure

Bezogen auf das Frischgewicht fiel die Aktivität der Sauren Phosphatase bereits nach 4 Stunden deutlich ab und blieb über den Versuchszeitraum hinweg bis zum 8.Tag p.i. verringert. Dieser Bezug besitzt jedoch geringen Aussagewert, da die erhaltenen Veränderungen zum großen Teil als reiner Verdünnungseffekt infolge Ödematisierung der Nieren zu werten sind. Bei Bezug auf das Gesamtorgan ergaben sich über den Versuchszeitraum gewisse Schwankungen der Werte um die Norm, die jedoch keinen Trend erkennen ließen. Die spezifische Aktivität der Sauren Phosphatase (Bezug: Protein) zeigte im Zeitraum von 16 Stunden bis zu 3 Tagen p.i. einen deutlich geringgradigen Abfall, der nach 48 Stunden bei einer max. Verringerung um 23% dosisabhängig war (Tab.29)

Tab. 29 : In vitro-Aktivität der Sauren Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure in Abhängigkeit von Zeit und Dosis (n = 4 Bestimmungen je Wert)

Zeile A : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung

Spalte A : Folsäuredosis in mg/kg K.-Gew.

Tab. 29:
========

Bezug: G.E. Frischgewicht												
A	4^h	6^h	8^h	12^h	16^h	24^h	2^d	4^d	6^d	8^d	14^d	21^d
60	85	55	67	67	71	80	69	83	78	99	111	96
120	72	58	67	57	58	73	68	60	66	100	97	80
180	70	61	65	56	57	65	53	57	58	94	88	79
Bezug: Gesamtorgan												
60	112	105	111	121	99	95	111	110	97	108	105	96
120	99	107	107	107	92	102	96	110	88	108	104	102
180	104	135	112	105	91	98	117	135	108	130	104	94
Bezug: Protein												
60	110	100	106	108	104	90	88	100	95	112	114	100
120	106	107	99	100	106	82	85	98	87	118	114	92
180	109	115	95	106	95	90	77	95	90	120	112	92

4.6.4. Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure

Die Folsäure bewirkte eine starke Verringerung der Alkalischen Phosphatase. Der Effekt war bei Bezug auf Protein im wesentlichen dem bei Bezug auf Gesamtorgan ermittelten homolog. In letzterem Fall wurde der Zeitpunkt der maximalen Veränderung schon früher erreicht (zwischen 16 und 24 Stunden p.i.). Der Abfall der spezifischen Aktivität (nach 8 Std.deutlich), erreichte sein Maximum am 2. Tag p.i. mit -59%. Anschließend stieg die Aktivität wieder an, bis am 14. Tag p.i. die Norm nach obenhin überschritten wurde (Tab.30, Abb.12). Zu den Versuchszeitpunkten zwischen 12 Stunden und 6 Tagen bestand Dosisabhängigkeit (Abb.13).

Tab. 30 : In vitro-Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure in Abhängigkeit von Zeit und Dosis (n = 4 Bestimmungen je Wert)

Zeile A : Zeit zwischen Folsäureapplikation und Aufarbeitung

Spalte A : Folsäuredosis in mg/kg K.-Gew.

Tab. 30 :
==========

Bezug: G.E.Frischgewicht												
A	4^h	6^h	8^h	12^h	16^h	24^h	2^d	4^d	6^d	8^d	14^d	21^d
60	73	49	64	46	52	79	51	74	82	94	113	76
120	68	49	59	45	39	50	58	45	63	60	103	73
180	64	54	57	37	31	32	28	41	53	59	102	50
Bezug: Gesamtorgan												
60	100	94	102	83	73	94	82	100	103	102	107	80
120	95	91	87	84	67	71	82	83	83	65	115	93
180	98	118	84	69	53	48	62	97	99	82	127	58
Bezug: G.E.Protein												
60	95	89	87	75	76	82	65	88	100	102	107	80
120	100	89	78	79	71	56	72	74	82	72	121	90
180	100	101	72	69	51	44	49	67	83	82	130	57

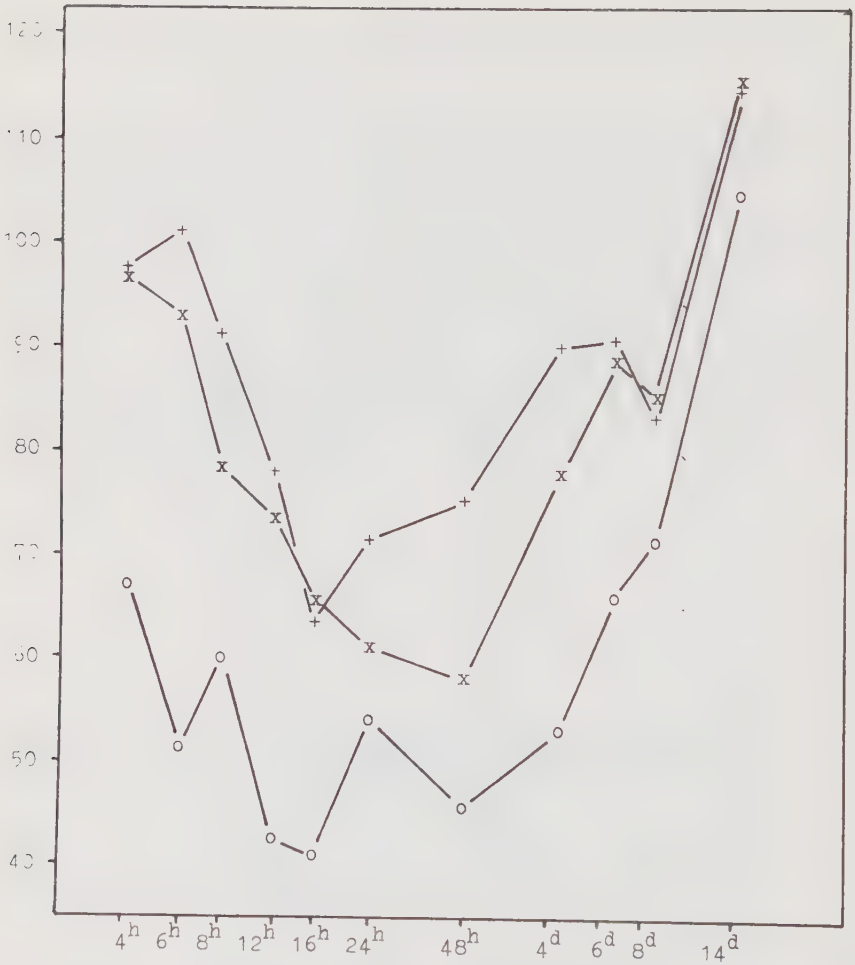


Abb. 12 : In vitro-Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure: Arithmetisches Mittel der Veränderungen nach 3 Folsäure-Dosen (60, 120 und 180 mg/kg K.-Gew.) in Prozent der Aktivität von Kontrollnieren in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt

Abszisse : Zeit p.i. in Stunden (^{h}) bzw. Tagen (^{d})

Ordinate : Aktivität der Alkalischen Phosphatase

o = Bezug: G.E.Frischgewicht
+ = Bezug: Gesamtorgan
x = Bezug: G.E.Protein

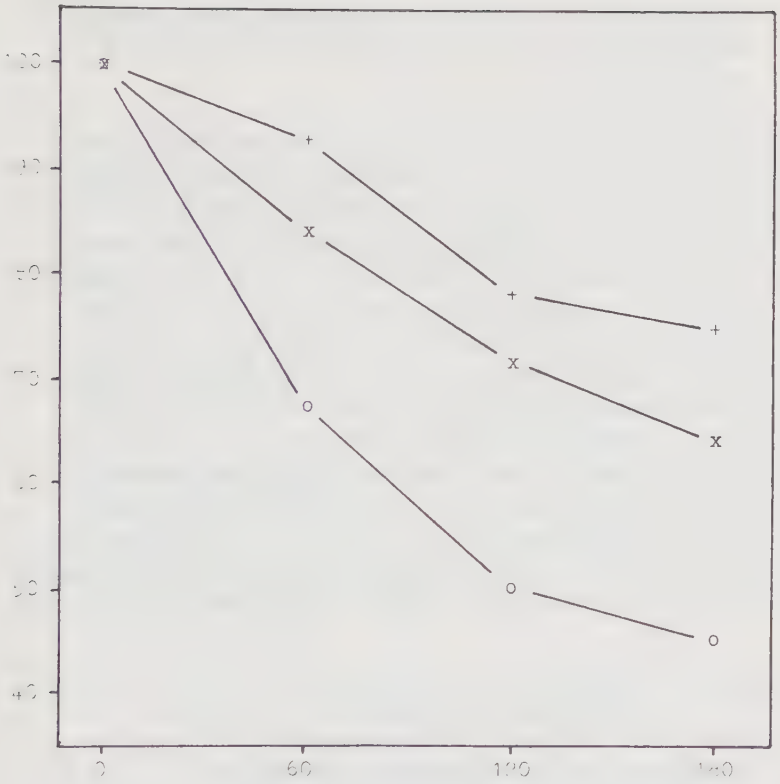


Abb.13 : In vitro-Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure in Abhängigkeit von der Dosis: Arithmetisches Mittel der im Zeitraum von 8 Stunden bis zum 8. Tag p.i. prozentual zu den jeweiligen Kontrollnieren erhaltenen Werte

Abszisse : Folsäuredosis in mg/kg K.-Gew.

Ordinate : Aktivität der Alkalischen Phosphatase

o = bezogen auf G.E.Frischgewicht

+ = bezogen auf Gesamtorgan

x = bezogen auf G.E.Protein

4.6.5. Phosphatase-Aktivitäten der Niere der Maus unter dem Einfluß von Folsäure: Statistische Bewertung der Ergebnisse

Zur Bestätigung der sich aus den vorangegangenen Versuchen ableitbaren Beeinflußbarkeit der Phosphataseaktivitäten der Niere durch Folsäurebelastung wurde zum Zeitpunkt der maximalen Veränderungen (48 Stunden p.i.) eine Signifikanzanalyse durchgeführt. Die Nieren von 4 mit einer Dosis von 120 mg/kg K.-Gew. behandelten Mäusen und von 4 Kontrolltieren wurden einzeln aufgearbeitet ($n_1=8$; $n_2=8$). Die Aktivitäten von Alkalischer und Saurer Phosphatase wurden in den Relationen zu G.E.Frischgewicht, Gesamtorgan und G.E.Protein gegen die Kontrollen einer Signifikanzanalyse unterzogen. Hierbei konnte für den gewählten Zeitpunkt eine deutliche Verringerung der Alkalischen Phosphatase unter dem Einfluß von Folsäure in allen Bezügen bestätigt werden. Für die Saure Phosphatase war ein Abfall in Bezug auf G.E.Frischgewicht und G.E.Protein signifikant, nicht jedoch in Bezug auf das Gesamtorgan (Tab.31).

Tab.31 : In vitro-Aktivität von Alkalischer und Saurer Phosphatase der Niere der Maus 48 Stunden nach Injektion von Folsäure in einer Dosis von 120 mg/kg K.-Gew. in Prozent des Kontrolldurchschnitts; wobei $n_1=8$ und $n_2=8$

Tab. 31:

	Alkalische Phosphatase				Saure Phosphatase			
Bezug: G.E.Frischgewicht								
	$\bar{x}$	Sx	t	p	$\bar{x}$	Sx	t	p
Kontr.	100	± 4,6			100	±26,4		
Fols.	27	± 6,5	31,0	<0,001	44	± 5,7	10,8	<0,001
Bezug: Gesamtorgan								
Kontr.	100	± 3,3			100	±24,6		
Fols.	64	±10,2	9,2	<0,001	90	±11,1	1,0	<0,05
Bezug: G.E.Protein								
Kontr.	100	± 7,9			100	± 7,9		
Fols.	41	± 7,8	17,0	<0,001	67	± 9,4	3,5	<0,01

4.6.6. Sedimentationsverhalten von Phosphatasen der Niere der Maus nach Folsäureeinwirkung

Wurden Nierenhomogenate von mit 120 mg/kg Folsäure behandelten Mäusen und von Kontrolltieren je 40 min bei 12500 x g zentrifugiert, so deutete sich für die spezifische Aktivität beider Phosphatasen bei den Folsäure-Nieren im Zeitraum von 3 Stunden bis zu 4 Tagen p.i. eine geringgradig verstärkte relative Sedimentierbarkeit an (Tab.32), welche sich aber statistisch nicht sichern ließ (Tab.33). Bei der am 8. Tag p.i. verzeichneten scheinbaren Verminderung der relativen Sedimentierbarkeit beider Phosphatasen muß als Vorbehalt in Betracht gezogen werden, daß in diesem Fall die Phosphatasen des verwendeten Kontrollhomogenates gegenüber dem Mittel der sonstigen Werte deutlich vermehrt sedimentierten.

Tab. 32 : Relative Phosphataseaktivität und Proteinkonzentration des 12500 x g-Überstandes eines Homogenats aus Nieren von mit 120 mg/kg Folsäure behandelten Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit p.i.. Die Werte sind prozentual auf die jeweiligen Kontrollen bezogen

Zeile A : Zeit p.i. in Stunden (^{h}) bzw. Tagen (^{d})

Zeile 1 : Aktivität der Alkalischen Phosphatase bezogen auf Frischgewicht

Zeile 2 : Aktivität der Alkalischen Phosphatase bezogen auf Protein

Zeile 3 : Aktivität der Sauren Phosphatase bezogen auf Frischgewicht

Zeile 4 : Aktivität der Sauren Phosphatase bezogen auf Protein

Zeile 5 : Proteinkonzentration

A	3^h	6^h	24^h	2^d	4^d	8^d	14^d
1	72	68	92	100	113	139	117
2	81	90	81	84	92	131	118
3	85	58	93	118	114	126	108
4	89	72	84	98	93	117	109
5	95	75	111	119	123	102	99

Tab. 33 : Spezifische Aktivität von Saurer und Alkalischer Phosphatase aus 25000 x g-Überständen im Mittel der im Zeitraum von 3 Stunden bis 4 Tagen nach Folsäurebelastung erhaltenen Werte in Prozent der Kontrollüberstände ($n_1=4$; $n_2=4$)

Zeile 1 : Kontrollüberstände

Zeile 2 : 120 mg/kg-Folsäure-Überstände

	Alkalische Phosphatase				Saure Phosphatase			
	$\bar{x}$	Sx	t	p	$\bar{x}$	Sx	t	p
1	100	$\pm$12,2	--	--	100	$\pm$7,0	--	--
2	86	$\pm$10,2	1,5	0,05	89	$\pm$11,2	1,5	0,05

4.6.7. Zur Wirkung membranlabilisierender Noxen auf das Sedimentationsverhalten von Phosphatasen der Niere der Maus nach Folsäureeinwirkung

6 Stunden, 3 Tage und 8 Tage p.i. wurden Kontrollhomogenate aus mit 60, 120 und 180 mg/kg K.-Gew. Folsäure behandelten Mäusen je zum Teil mit 0,02% Triton X 100 versetzt, zum Teil 3 min beschallt. In einem weiteren Versuch wurde die Ultraschallwirkung am 2. Tag p.i. untersucht. Es ergab sich für beide Zusatznoxen eine im wesentlichen dosisabhängig gegenüber den Kontrollen verringerte Sedimentierbarkeit beider Phosphataseaktivitäten am 3. Tag p.i., für die mit Ultraschall behandelten Homogenate auch am 2. Tag. Eine Kombination beider Noxen am 3. Tag p.i. führte zu keiner Verstärkung des Effekts. Bei den 6 Stunden p.i. angestellten Untersuchungen zeigte nur die Alkalische Phosphatase nach Einwirkung von Triton X 100 eine geringfügig verminderte Sedimentierbarkeit, während sich 8 Tage p.i. ausschließlich Kontrollwerte ergaben (Abb.14 mit18).

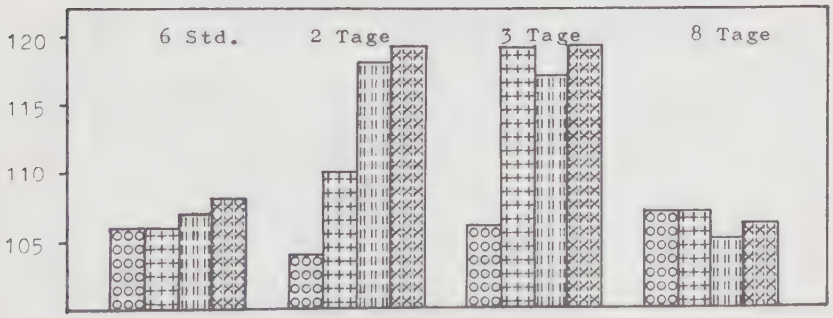


Abb. 14: Alkalische Phosphatase-Aktivität von 12500 x g (20 min) -Überständen aus Nieren-Homogenaten folsäurebelasteter Mäuse nach Einwirkung von Ultraschall auf das Homogenat.

(Werte in Prozent der unbehandelten Kontrollüberstände)

Säule: Kontrollen
60 mg/kg Folsäure
120 mg/kg Folsäure
180 mg/kg Folsäure

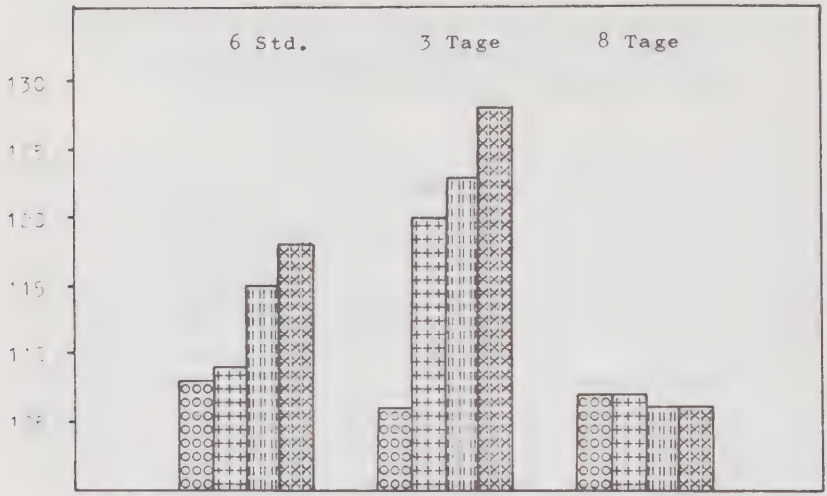


Abb.15: Alkalische Phosphatase-Aktivität von 12500 x g (20 min) -Überständen aus Nieren-Homogenaten folsäurebelasteter Mäuse nach Zusatz von Triton X 100 zum Homogenat.

Kennzeichnung der Säulen s. Abb. 14

Abb.16: Saure Phosphatase-Aktivität von 12500 x g (20 min) -Überständen aus Nieren-Homogenaten folsäurebelasteter Mäuse nach Einwirkung von Ultraschall auf das Homogenat.

Kennzeichnung der Säulen s. Abb. 14

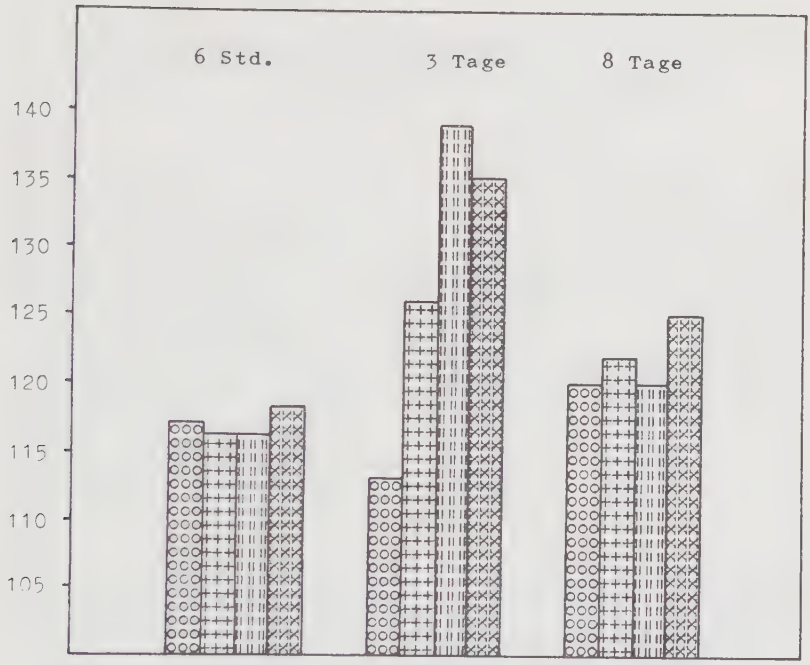


Abb.17: Saure Phosphatase-Aktivität von 12500 x g (20 min) -Überständen aus Nieren-Homogenaten folsäurebelasteter Mäuse nach Zusatz von Triton X 100 zum Homogenat.

Kennzeichnung der Säulen s. Abb.14

5. DISKUSSION

5.1. Reaktionsbedingungen von Phosphatasen der Mäuseniere in vitro

5.1.1. pH-Optimum

Bei Verwendung von A c e t a t - Puffer war die Aktivität der S a u r e n Phosphatase bei einer Wasserstoffionenkonzentration entsprechend pH 5,2 optimal. Das ermittelte Ergebnis stimmt somit mit den Untersuchungen zahlreicher Autoren überein, die für die Saure Phosphatase unterschiedlichster Herkunft pH-Werte von 4,9 bis 5,4 als optimal angeben [vergl.: für die Rattenleber (36,44,77,80,124,154); Rattenniere (17); menschliche Prostata (136, 140); Amphibien (101,104,165,166); Tumoren bei Ratten und Mäusen (26,67,85,92,134,135); Hühnerembryo (21,81,103,104,130,131)].

Das pH-Optimum der A l k a l i s c h e n Phosphatase, deren Aktivität unter Verwendung von Glycin-Puffer bestimmt wurde, lag bei pH 10,25. Die von anderen Autoren unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten In vitro-Ansätze ergaben pH-Optima zwischen 9,5 und 10,25 (56,62,80,97,103,104). Bei allen Angaben über optimale Wasserstoffionenkonzentrationen ist zu berücksichtigen, daß das pH-Optimum von zahlreichen Faktoren des Ansatzes mitbestimmt wird; so führt z.B. ein Ansteigen der Substratkonzentration zu einer Verschiebung in den alkalischen Bereich (76).
Die meisten Untersuchungen an Saurer und Alkalischer Phosphatase werden einheitlich bei pH 5,0 bzw. 10,0 durchgeführt (77,80,93,101,131,136). Da im übrigen unter sehr ähnlichen Bedingungen gearbeitet wird, wird gelegentlich offenbar ein nicht unerheblicher Aktivitätsverlust in Kauf genommen (81).

5.1.2. Ionen-Optimum, Kofaktoren und Inhibitoren

Im Bereich zwischen 0,038 M und 0,152 M zeigte der p-NPP-Abbau an Mäusenierenhomogenat bei pH 5,2 keine Abhängigkeit von der Natriumacetatkonzentration des Puffers. In zahlreichen

anderen Untersuchungen werden Konzentrationen von 0,05 bis 0,2 M als optimal angegeben (44,80,85,93,131,136,146, 163,166). Allerdings ermittelte BEURER (17) bei Versuchen an der Rattenniere eine wesentlich höhere optimale Ionenstärke.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Mäuseniere war im Glycin-NaOH-gepufferten Reaktionsgemisch bei einer $MgCl_2$-Konzentration entsprechend 0,002 M optimal. Verringerung des $MgCl_2$-Gehalts auf 1/16 der optimalen Konzentration bewirkte eine nur 9 %ige Aktivitätseinbuße. Eine ähnlich unscharfe Abgrenzung des $MgCl_2$-Optimums wird auch für die Alkalische Phosphatase der Rattenniere und des Hühnerembryos beschrieben (17,81). Zusatz von Zinkionen in Form von $ZnSO_4$ bewirkte eine 8 %ige Erhöhung der Aktivität der Sauren Phosphatase der Mäuseniere (v.B.), während die gleiche Konzentration beim Hühnerembryo zu einer max. 60 %igen Aktivitätssteigerung des Enzyms führte (81).

Durch 5 mM Tartrat im Ansatz ließ sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauren Phosphatase der Mäuseniere um 3o% verringern. Eine stärkere Hemmung konnte auch durch Erhöhung der Tartrat-Konzentration nicht erreicht werden. Während Saure Phosphatase aus Rattenleber und Prostata stark tartratempfindlich ist (118,141), ließ sich für jene der Rattenniere keine Tartrathemmbarkeit nachweisen (17).

5.1.3. Substratkonzentration

Für den p-NPP-Abbau an Phosphatasen der Mäuseniere ergaben sich MICHAELIS-Konstanten von $8{,}49 \times 10^{-3}$ M (Saure Phosphatase) und $1{,}06 \times 10^{-2}$ M (Alkalische Phosphatase). Die Substrataffinität beider Phosphatasen der Niere der Maus ist somit deutlich geringer als jene der Rattenniere. Für dieses Organ werden, allerdings bei nicht immer vergleichbaren Reaktionsbedingungen Km-Werte von $1{,}07 \times 10^{-3}$ M für die Saure Phosphatase (17) und von $1{,}3 \times 10^{-3}$ bis $5{,}0 \times 10^{-5}$ M für die Alkalische Phosphatase (17,76) angegeben. Auch beide Esterasen des Säugerdarms (K_m je $2{,}5 \times 10^{-4}$ M) (69) und die Saure Phosphatase der menschlichen Prostata ($K_m = 1{,}01 \times 10^{-4}$ M) (LOPEZ, zit. bei 81) besit-

zen gegenüber jenen der Mäuseniere eine relativ hohe Affinität zum Substrat, während die Phosphatasen des Hühnerembryos mit K_m-Werten von $3,4 \times 10^{-2}$ M (Saure Phosphatase) und $4,4 \times 10^{-2}$ M (Alkalische Phosphatase) verhältnismäßig schwach reagieren (81). Ähnliche Substrataffinität wie die Saure Phosphatase der Mäuseniere zeigte z.B. das aus Schwanzgewebe von Xenopuslarven gewonnene Enzym mit K_m-Werten von 3,9 bis $7,8 \times 10^{-3}$ M (166). Die MICHAELIS-Konstante ist offensichtlich in hohem Maße von den Reaktionsbedingungen, wie Art und Konzentration des verwendeten Puffergemischs, abhängig. So ermittelten RICK und HAUSAMEN (zit. bei 17) bei Untersuchungen über die Alkalische Phosphatase des Serums unter Verwendung verschiedener Pufferlösungen um fast eine Größenordnung differierende MICHAELIS-Konstanten.

5.2. Zur Problematik von In vitro-Untersuchungen

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Enzymbestimmungen wurden an Nierenhomogenaten durchgeführt.Es handelt sich also um In vitro-Untersuchungen. Rückschlüsse auf In vivo-Verhältnisse sind somit nur bedingt möglich.
Die Enzymverteilung ist in der lebenden Zelle streng geordnet, wobei jedes Enzym bestimmten subzellulären Komponenten zugeordnet ist (wie dem Kern, den Mitochondrien, dem endoplasmatischem Retikulum und dem Zytosol). Auch die einzelnen Enzymaktivitäten befinden sich in ihrer Korrelation untereinander in einem ausgewogenen System. Dasselbe gilt für die ebenfalls in der Zelle vorhandenen enzymspezifischen Inhibitoren und Aktivatoren. Auch die schonendste Homogenisation bringt, da hierbei eine Zerstörung der Zellen notwendig ist, eine extreme Unordnung in das in vivo geordnete Enzymmuster. Die zytoplasmatischen Enzyme werden statistisch verteilt, die Zellmembran platzt, und das endoplasmatische Retikulum zerbirst, wobei als Artefakte die sog. Mikrosomen entstehen. Es kommt zu ungeordneter und unkontrollierter Freisetzung und Bindung von Aktivatoren und Inhibitoren, zu feedback-Effekten durch allosterische Transformation der Enzyme.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten aus Homogenaten ist also, strenggenommen, größtenteils eine Bestimmung von " Artefakten ".

5.3. Vorkommen und biologische Bedeutung von Phosphatasen in der Niere

Die Niere gilt als ausgesprochen phosphatasereiches Organ (48). Beim Menschen steht sie, was die Aktivität der Alkalischen Phosphatase betrifft, nach Duodenum, Knochen und Leber an 4. Stelle, während sie nach ihrem Gehalt an Saurer Phosphatase hinter Erythrozyten und Prostata den 3. Platz einnimmt (ibid.). Allgemein ist in der Niere die Aktivität der Alkalischen Phosphatase höher als jene der Sauren (94). Unter den vorliegenden Bedingungen verhielten sich die beiden Enzymaktivitäten der Niere der Maus wie 9 : 1. Ein wesentlich engeres Verhältnis (4 : 1) wird für die Niere der Ratte angegeben (17).
Die Alkalische Phosphatase der Niere ist vor allem in den Tubuluszellen, besonders jenen des proximalen Konvoluts lokalisiert (47,48,94,95,121,122), während die Aktivität der Sauren Phosphatase in den Glomerula gegenüber den anderen Nierenabschnitten deutlich erhöht ist (94). Der hohe Phosphatasegehalt der Niere scheint in ursächlichem Zusammenhang mit der Phosphatausscheidung im Harn zu stehen (88). Ferner ist die Bedeutung von Phosphatasen für nierenspezifische Phosphorylierungsvorgänge und die Möglichkeit einer Beteiligung von Phosphatasen bei der Glucoserückresorption aus den Tubuli zu diskutieren (88,169).
Nur Proteine mit einem Molekulargewicht unter 69000 bis 70000 können im Glomerulum in messbaren Mengen ultrafiltriert werden (18,47,95). Die Saure Phosphatase (121) und beispielsweise auch die DNase I (138) erfüllen diese Voraussetzung, während die Alkalische Phosphatase mit einem Molekulargewicht von 100000 (121) unter physiologischen Bedingungen nicht glomerulär filtrierbar ist. Die beim Menschen und praktisch allen Versuchs- und Haustieren normalerweise im Harn nachweisbare Alkalische Phosphatase stammt vor allem aus den Epithelien der

proximalen Tubulusanteile (47,48,94,95,122,123). Jede Schädigung der Tubuluszellen führt zu vermehrter Ausscheidung von Alkalischer Phosphatase im Harn. Bei entsprechend hohem Enzymverlust sinkt die Alkalische Phosphataseaktivität im Nierengewebe (47,48,58,94,95,122,123).

5.4. Phosphatasen der Niere der Maus unter dem Einfluß hoher Folsäuredosen

5.4.1. In vitro-Aktivitäten der Homogenate

Während für histiolytische Prozesse eine erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme nachgewiesen ist (43,45,135), sind Art und Umfang einer lysosomalen Beteiligung an proliferativen Vorgängen nach wie vor umstritten (87,161). Eine lysosomale Desoxyribonuclease (DNase II) z.B. erfährt bei induzierten Zellteilungsvorgängen sowohl in der nach Teilhepatektomie regenerierenden Rattenleber (108), als auch im Laufe der Folsäureschädigung der Niere der Maus (153) einen deutlichen Aktivitätsanstieg (Abb.18). Die Befunde an der folsäuregeschädigten Niere lassen sich jedoch nicht uneingeschränkt der erhöhten Zellteilung zuordnen, da hier die schädigungsbedingten resorptiven Prozesse mit den proliferativen mehr oder minder synchron verlaufen (ibid.). Die vorliegenden Ergebnisse über das Verhalten der Sauren Phosphatase stützen die Hypothese einer generellen lysosomalen Beteiligung (via Membranlabilisierung) bei der induzierten Mitose nicht, da die Aktivität des genannten Enzyms eine eher rückgängige Tendenz zeigte. Der Aktivitätsanstieg der DNase II dürfte auf einer selektiven Induktion beruhen, wofür auch die teilweise Hemmbarkeit der Aktivitätssteigerung z.B. durch Cycloheximid, Röntgenbestrahlung und Polyvinylsulfat (152,153) spricht.
Bei Nierenschädigungen verschiedenster Genese ist ein Abfall des Gehalts an Alkalischer Phosphatase zu verzeichnen. So wird z.B. von mehreren Autoren für die Niere nach hochdosierter Lokalbestrahlung eine Verringerung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase beschrieben (84,100). Der massive

Aktivitätsverlust der Alkalischen Phosphatase, wie er sich an der Niere von Ratte (132) und Maus (v.B.) in den ersten 2 - 4 Tagen nach hohen Folsäuregaben zeigt, überrascht um so weniger, als auch für ATPase, Isocitronensäuredehydrogenase, Malatdehydrogenase (70,132) und DNase I (153) (Abb.18) vergleichbare Enzymverluste angegeben werden.

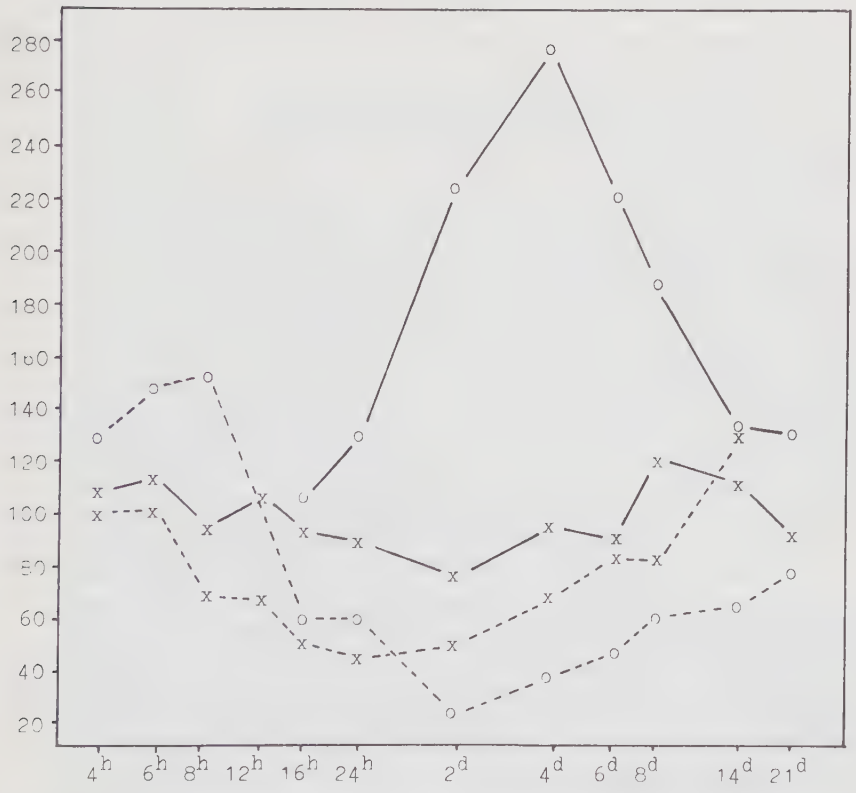


Abb.18 : Phosphatasen und DNasen der Niere unter dem Einfluß von Folsäure (180 mg/kg K.-Gew.)

Abszisse: Versuchszeitpunkt

Ordinate: Spezifische In vitro-Aktivität in Prozent der Norm

o —— DNase II x —— Saure Phosphatase

o ---- DNase I x ---- Alkalische Phosphatase

Das Verhalten der Alkalischen Phosphatase der Niere nach Schädigung durch Folsäure ist mithin ein verläßliches Kriterium des Schädigungsgrades und verweist zugleich auf den - auch morphologisch gesicherten - vorwiegend tubulären Charakter der Veränderungen. Die unmittelbaren Folgen der Phosphatase-Reaktion für die Funktion des Organs bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.4.2. Subzelluläre Verteilung

5.4.2.1. Zur Isolierung subzellulärer Partikel

Aufschließung des Gewebes

" Homogenisation is still largely an art "; deDUVE 1967 (38). Zur Minimierung physikalischer Schädigung subzellulärer Strukturen muß möglichst schonend homogenisiert werden. Im Idealfall sollte nur die Zellmembran platzen, die einzelnen Organellen aber intakt bleiben, ein Ziel, das praktisch nicht erreichbar ist. Die herkömmlichen Messerhomogenisatoren (waring blendor) sind deshalb für Fraktionierungszwecke völlig ungeeignet. Am besten bewährt haben sich Homogenisatoren mit rotierendem Kolben, z.B. jener nach POTTER-ELVEHJEM. Um eine Agglutination von subzellulären Organellen zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung von nicht-ionischen Suspensionsmedien (31). Wässrige Saccharoselösung in einer Molarität von 0,25 - 0,3 besitzt genügend osmotisches Potential, um Schwellung und Bersten der Partikel zu verhindern (13). Im Homogenat befinden sich die Zellbestandteile teils in gelöster, teils in suspendierter Form; gelöst: das schon vorher strukturlose Zytosol und aus beschädigten Partikeln ausgetretene lösliche Substanzen, suspendiert: subzelluläre Organellen und deren Fragmente. Da eine gewisse Desintegration der Zellorganellen unvermeidlich ist, erfordert die Erlangung vergleichbarer Homogenate eine weitestgehende Vereinheitlichung des Beschädigungsgrades. Dies gelingt nur bei völliger Standardisierung der Homogenisationsmethodik (2), d.h. identischen Größen für Temperatur, Homogenisationsdauer, Drehzahl und Druck. Vor allem die beiden letzteren Forderungen sind bei Verwendung halbmanueller Homogenisatoren nicht voll erfüllbar.

Trennung subzellulärer Partikel

Unterschiedliche physikalische Eigenschaften wie Größe, Form, Dichte und der daraus resultierende Sedimentationskoeffizient ermöglichen eine Trennung der verschiedenen korpuskulären Zellkomponenten. Allerdings sind die meisten Populationen subzellulärer Partikel in Bezug auf ihre für eine Fraktionierung verwertbaren Eigenschaften in sich unterschiedlich.

Diese Heterogenität wird durch homogenisationsbedingte Beschädigungen noch vergrößert. Werden ganze Organe verarbeitet, so ergibt sich eine weitere Komplikation durch deren Gehalt an verschiedenen Zellspezies (besonders bei der Niere).
Die meistverwendete Fraktionierungsmethode ist die differentielle Zentrifugation, die auf den unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten der einzelnen Partikel beruht. Hierbei sedimentieren die 4 " klassischen " Fraktionen in folgender Reihenfolge: Kerne, Mitochondrien (large granules), Mikrosomen (small granules = Teile des endoplasmatischen Reticulums mit Ribosomen), und schließlich die Proteine des Zytosols.
Eine weitere Auftrennung dieser relativ groben Fraktionen ermöglicht die Dichtegradientenzentrifugation. Diese beruht auf der Tatsache, daß die physikalischen Eigenschaften der meisten subzellulären Partikel eine gewisse Variabilität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Suspensionsmediums besitzen. Ferner ist die Relation zwischen der Dichte der Verdünnungsflüssigkeit und den Eigenschaften der Partikel nicht unbedingt für jede Partikelgruppe die gleiche, so daß Zellbestandteile, welche in einem Medium nicht trennbar sind, sich in einem anderen isolieren lassen. Bei der Dichtegradientenzentrifugation wird das aufzutrennende Material einer unvollständigen Sedimentation in einem stabilisierten Gradienten (hergestellt durch Überschichten von Lösungen - meist Saccharose in H_2O oder D_2O - verschiedener Konzentration) unterworfen. Die homologen Fraktionen reichern sich in bestimmten Ebenen des Gradienten an. Auf dem gleichen Prinzip beruht auch die Dichtegleichgewichtszentrifugation, bei der man ein Suspensionsmedium von gleicher Dichte, wie die abzutrennenden Partikel wählt. Nach langdauernder Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit findet sich nur noch die gesuchte Population in der flüssigen Phase.
Weniger gebräuchliche Fraktionierungsmethoden sind Chromatographie, Elektrophorese und Phasentrennung.

Beurteilung der Fraktionen

Hierfür bieten sich prinzipiell zwei Techniken an, die morphologische und die biochemische. Die ältere morphologische Methode besitzt schwerwiegende Nachteile (38): Nicht alle subzellulären Strukturen sind morphologisch eindeutig charakterisiert, quantitative Aussagen sind wegen der extrem kleinen untersuchbaren Ausschnitte kaum möglich und eine Fülle von homogenisationsbedingten Artefakten ist morphologisch nicht zu definieren. Auch Verunreinigungen, deren Größe unterhalb des Auflösungsvermögens des benutzten Instruments liegt, entgehen dem Untersucher. Ferner führt die Pelletierung des Sediments bei der Zentrifugation zu Formveränderungen der Partikel, wobei sich die aus der Peripherie des Sediments stammenden morphologisch deutlich von jenen aus dem Zentrum unterscheiden (13).
Biochemische Untersuchungen bieten den Vorteil, daß sie bequem eine objektive und quantitative Beurteilung der jeweiligen subzellulären Präparation ermöglichen. Die Kriterien hierzu beruhen auf den beiden Postulaten von deDUVE (42), welche die Interpretation von Enzymverteilungsmustern bei Gewebsfraktionierungen ermöglichen:

1.) " a given enzyme belongs to a single intracellular component in the living cell "

2.) " granules of a given population are enzymically homogeneous, or at least cannot be seperated by centrifugation into subgroups differing significantly in relative enzyme content "

Die Aktivität eines bestimmten Enzymes ist also Index für die Häufigkeit einer bestimmten Zellorganelle, wenn dieses Enzym mit der Organelle in spezifischer und einheitlicher Weise verbunden ist. Diese Voraussetzung ist für viele Enzyme gegeben, was die Einführung des Begriffs " Leitenzym " (marker enzyme) ermöglichte. So sind z.B. Cytochromoxydase und Succinatdehydrogenase eindeutige Kennzeichen für Mitochondrien der meisten Gewebe, Katalase aus Leber und Niere ist bezeichnend für Peroxysomen und die Glucose-6-phosphatase der Leber gilt als Leitenzym für mikrosomale Membranen aus dem endoplasmatischen Reticulum. Saure Phosphatase und Saure DNase schließlich sind spezifisch für Lysosomen.

5.4.2.2. Vorliegende Untersuchungen

a.) Zuordnung

Durch 20 min. Zentrifugation bei 25000 x g waren 34% der Sauren und 60% der Alkalischen Phosphataseaktivität aus Mäusenierenhomogenat sedimentierbar (v.B.). Eine in der Verteilung gleichsinnige, im Umfang aber wesentlich stärkere Sedimentierbarkeit wird für die Phosphatasen der Rattenniere mit 60% für die Saure bzw. 80% für die Alkalische Phosphatase angegeben (17). Ein weiterer Hinweis für die Zuordnung beider Phosphatasen zu verschiedenen subzellulären Populationen ergibt sich aus der unterschiedlichen Beeinträchtigung ihrer Sedimentierbarkeit nach Anwendung membranlabilisierender Noxen. So ist die Alkalische Phosphatase der Mäuseniere (v.B.) ebenso wie jene von Hühnerembryo und Mäuseleber (81) durch Ultraschall gegenüber der Sauren vermehrt freisetzbar. Andererseits bewirkt das nichtionische Detergens Triton X 100 eine deutlichere Labilisierung der Sauren Phosphatase (v.B.). Im Vergleich mit anderen Enzymen zeigte die Saure Phosphatase ein der DNase II und GLDH ähnliches Sedimentationsverhalten, während die Alkalische

Phosphatase analog zur DNase I sedimentierte (v.B.).

b.) Schädigung

Die Folsäureschädigung der Niere der Maus scheint keinen direkten Einfluß auf das Sedimentationsverhalten von Phosphatasen auszuüben. Die unter den gewählten Versuchsbedingungen verzeichnete geringgradige Erhöhung der Sedimentierbarkeit beider Enzyme (v.B.) ließ sich statistisch nicht sichern. Die Tatsache, daß eine zusätzliche Behandlung der " Folsäurenieren "-Homogenate sowohl mit Ultraschall als auch mit Triton X 100 eine geringgradige, aber zum Zeitpunkt der maximalen Schädigung in gewissem Umfang folsäuredosisabhängige Verringerung der Sedimentierbarkeit beider Phosphatasen gegenüber den Kontrollhomogenaten bewirkte (v.B.), läßt an die Möglichkeit einer folsäurebedingten latenten Membranschädigung denken, welche erst durch Zusatznoxen manifest wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

An rund 800 weißen Mäusen im Gewicht von 20 ± 2 g wurde das Verhalten der In vitro-Aktivitäten zweier Phosphomonoester-Hydrolasen der Niere 4 Stunden bis 21 Tage nach einmaliger i.v. Injektion von Folsäure in Dosen von 60, 120 und 180 mg/kg K.-Gew. untersucht. Einige Reaktionsbedingungen der beiden Enzyme, ihre subzelluläre Verteilung und Labilisierbarkeit unter Normalbedingungen sowie nach Folsäureschädigung waren gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Ferner wurde die Toxizität von Folsäure für weiße Mäuse beider Geschlechter ermittelt. Die wesentlichsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1.) Die DL_{50} von Folsäure betrug für männliche Tiere 240 - 260 und für weibliche 175 - 183 mg/kg..

2.) Das pH-Optimum der Sauren Phosphatase lag im Essigsäure-Natriumacetat-Puffer bei 5,2. Die Aktivität des alkalischen Enzyms war im Glycin-NaOH-Puffer bei einer Wasserstoffionenkonzentration entsprechend pH 10,25 optimal.

3.) Im pH-Optimum zeigte die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauren Phosphatase keine Abhängigkeit von der Natriumacetat-Konzentration des Puffers. Für die Alkalische Phosphatase erwies sich eine $MgCl_2$-Konzentration von 0,002 M als optimal.

4.) Der Zusatz von 1 mM Tartrat zum Ansatz verringerte die Reaktionsgeschwindigkeit der Sauren Phosphatase um 3o%. Zn^{++}-Ionen (5 mM) bewirkten eine nur geringgradige Aktivitätssteigerung des Enzyms um 8%.

5.) Unter den Bedingungen zeit- und enzymkonzentrationsproportionaler Umsatzraten ergaben sich für die p-Nitrophenylspaltung MICHAELIS-Konstanten von $8,49 \times 10^{-3}$ M für die Saure und $1,06 \times 10^{-2}$ M für die Alkalische Phosphatase.

6.) Wurde die Inkubationstemperatur von 22°C auf 35°C erhöht, vergrößerte sich die Umsatzrate an Saurer wie an Alkalischer Phosphatase um das 2fache. Eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur führte zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit beider Enzyme.

7.) Durch 20 min. Zentrifugation von Nierenhomogenat in 0,25 M Saccharose bei 25000 x g waren 34% der Sauren und 60% der Alkalischen Phosphatase sedimentierbar. Zusatz von Triton X 100 und Behandlung mit Ultraschall verringerte die Sedimentierbarkeit beider Enzyme.

8.) Hohe Folsäuredosen bewirkten eine massive Erhöhung des relativen Nierengewichts, welche am vierten Tag p.i. mit + 137% (bei 180 mg/kg) maximal war.

9.) Der Proteingehalt der Niere erfuhr unter dem Einfluß von Folsäure eine deutliche, am zweiten Tag p.i. maximale (+ 53% bei 180 mg/kg) Steigerung.

10.) Unter Folsäureeinwirkung fiel die spezifische Aktivität der Sauren Phosphatase im Zeitraum von 16 Stunden bis 3 Tagen p.i. deutlich, wenn auch geringgradig ab. Der Aktivitätsabfall war 48 Std. p.i. bei einer maximalen Verringerung um 23% dosisabhängig.

11.) Die Folsäure bewirkte eine starke Verminderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Der Abfall der spezifischen Aktivität erreichte mit -59% sein Maximum am zweiten Tag p.i.. Zu den Versuchszeitpunkten zwischen 12 Std. und 6 Tagen bestand Dosisabhängigkeit.

12.) Eine geringgradig verstärkte relative Sedimentierbarkeit beider Phosphatasen in den ersten vier Tagen nach Folsäureeinwirkung konnte statistisch nicht gesichert werden.

13.) Zusätzliche Behandlung von Nierenhomogenaten folsäuregeschädigter Mäuse mit Triton X 100 (0,02%) und Ultraschall verringerte die Sedimentierbarkeit beider Phosphatasen im Zeitraum zwischen zwei und drei Tagen p.i. weitgehend folsäuredosisabhängig, wobei für beide Enzyme Triton X 100 deutlich wirksamer war.

14.) Der Aktivitätsabfall der Alkalischen Phosphatase ist als Enzymverlust aus geschädigten Zellen und subzellulären Strukturen deutbar. Er verhält sich zum Grad der Nierenschädigung korrelativ.

Investigations on phosphatases of mouse kidney: Biochemistry and effects of high doses of folic acid thereon.

Summary

With approximately 800 white mice studies were carried out as to the behaviour of the in vitro-activities of two phosphomonoester-hydrolases of the kidney at different times (4 hours to 21 days p.i.) after single intraveneous injections of folic acid in doses of 60, 120 and 180 mg/kg body weight. Some reaction conditions of the two enzymes, their subcellular distribution and state of bonding under normal conditions as well as after lesion induced by folic acid were also subjects of the investigations. Further the toxicity of folic acid has been tested with mice of both sexes.

The main results have to be summarized as follows:

1.) The DL_{50} of folic acid was between 240 and 260 mg/kg body weight for male mice and between 175 and 183 mg/kg for females.

2.) The pH-optimum of acid phosphatase in acetic acid-sodium acetate-buffer could be demonstrated at pH 5,2. The activity of the alkaline enzyme in glycine-NaOH-buffer was optimal at a hydrogen ion concentration corresponding to pH 10,25.

3.) With optimal pH-values, the reaction rate of the acid phosphatase showed no dependence on the sodium-acetate-concentration of the buffer. Activity of the alkaline phosphatase was proved to be optimal at $MgCl_2$-concentrations of 0,002 M.

4.) By addition of 1 mM tartrate to the incubation medium the reaction rate of acid phosphatase diminished by 30%. Zn^{++}-ions (5 mM) caused an increase in activity of the enzyme by 8% only.

5.) When reaction rates were linear in dependence on time and enzyme concentrations, MICHAELIS constants were

found to be $8,49 \times 10^{-3}$ M for the acid phosphatase and $1,06 \times 10^{-2}$ M for the alkaline one.

6.) By increasing the incubation temperature from 22°C to 35°C, the reaction rate of both phosphatases was enhanced by about two times. Higher temperature reduced the reaction rate of both enzymes.

7.) When centrifugating kidney homogenates in 0,25 M sucrose at 25000 x g, 34% of the acid and 60% of the alkaline phosphatase were sedimentable. Addition of Triton X 100 and treatment with ultrasound diminished the sedimentability of both enzymes.

8.) High doses of folic acid caused a very significant rise of the relative kidney weight, which was maximal (+ 137%) at the 4th day of experiment.

9.) The protein content of the kidney increased also under the influence of high doses of folic acid. With folic acid-doses of 180 mg/kg values have been reached, which were highest (+ 53%) at the second day of experiment.

10.) Under the influence of folic acid the specific activity of acid phosphatase decreased between 16 hours and 3 days p.i. distinctly. This decrease behaved dose-dependent at 48 hours p.i., where the activity was diminished by 23%.

11.) Folic acid caused a high significant diminution of the activity of the alkaline phosphatase. This diminution reached its maximum at the second day p.i. with values which were about 60% lower than controls. Between 12 hours and 6 days dose-dependence has been shown.

12.) A little intensified relative sedimentibility has been shown in the first four days after the influence of folic acid, but could not be statistically guaranteed.

13.) Additional treatment of kidney homogenats of folic acid-injured mice with Triton X 100 (0,02%) and ultrasound reduced the sedimentability of both phosphatases in the period between two and three days p.i. in dependence on the folic acid-dose. The influence of Triton X 100 has been shown to be distinctly more effective in regard to this effect.

14.) Results suggest, that the fall of activity of the alkaline phosphatase in kidneys of folic acid-treated mice is the result of loss of enzyme out of damaged cells or subcellular structures. There seems to be a strict correlation between activity-loss and degree of lesion.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, J.M.:
Lysosomes in bacterial infection.
pp.41 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 2 (wie 45)

2. ALLFREY, V.:
The isolation of subcellular components.
pp.193 ff in: BRACHET, J. and MIRSKY, A.E. (eds.): The cell.
Biochemistry, physiology, morphology, Vol.1.
New York, London: Academic Press 1959

3. ALLISON, A.C.:
Lysosomes.
Biol.Basis Med. 1, 227 (1968)

4. ALLISON, A.C.:
Lysosomes in normal and abnormal cellular reactions.
Spectrum 5, 101 (1967)

5. ALLISON, A.C. and MALUCCI, L.:
Lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes.
The Lancet 26, 1371 (1964)

6. ALLISON, A.C. and PATON, G.R.:
Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes.
Nature 207, 1170 (1965)

7. AOSHIMA, M., TSUKAGOSHI, S. and SAKURAY, Y.:
Biochemical changes in tumor cells caused by antitumor agents. III.Further studies on the effects of antitumor agents on NADase and a few lysosomal enzymes of Yoshida sarcoma cells.
Gann. 58, 75 (1967)

8. ARVY, L.:
Les reins et l'acide pteroylmonoglutamique.
Laval Medical 40, 1073 (1969)

9. ASHFORD, T.P. and PORTER, K.R.:
Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes.
J. Cell. Biol. 12, 198 (1962)

10. AUSTIN, J., ARMSTRONG, D. and SHEARER, L.:
Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis. V. The nature and significance of low sulfatase activity: A controlled study of brain, liver and kidney in four patients with metachromatic leucodystrophy (MLD).
Arch. Neurol. (Chicago) 14, 259 (1966)

11. BARKA, T.:
Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland.
Exp. Cell. Res. 39, 355 (1965)

12. BASERGA, R., THATCHER, D. and MARZI, D.:
Cell proliferation in mouse kidney after a single injection of folic acid.
Lab. Invest. 19, 92 (1968)

13. BEAUFAY, H.:
Methods for the isolation of lysosomes.
pp. 515 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 1 (wie 45)

14. BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, T., CZOK, R., GARBADE, K.J., MEYER-ARENDT, E. und PFLEIDERER,G.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

15. BENCOSME, S.A. and MORRIN, P.A.F.:
Ultrastructural pathology of the glomerulus.
pp. 143 ff in: Ultrastructure of the kidney.
New York: Academic Press 1967

16. BERTOLINI, B. and MORETTI, Th.:
Localisation of acid phosphatase in the striated musculature and connective tissue of the regenerating tail of Triturus cristatus.
Atti.Accad.Naze.Luicei.Rend., Classe Sci.Fis.,Mat.Nat. 31, 172 (1961)

17. BEURER, K.-H.:
Zur Wirkung von Ganzkörperröntgenbestrahlung und 2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin auf DNS, Desoxyribonucleasen und Phosphatasen der Rattenniere.
Diss. med. vet., München 1970

18. BLAINLEY, J.D.:
The renal excretion of higher molecular weight substances.
pp. 85 ff in: DUBACH, U.C. (ed.): Enzymes in urine and kidney.
Bern und Stuttgart: Huber 1968

19. BLAKLEY, R.L.:
The biochemistry of folic acid and related pteridines.
Amsterdam, London: North-Holland 1969

20. BOEHRINGER, C.F.:
Test-Fibel:
Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase.

21. BRACHET, J.:
Contribution à l'étude des lysosomes a cours du développement embryonnaire.
Bull. Sci. chim. Biol. 40, 2039 (1958)

22. BRADE, W. und PROPPING, P.:
Akutes Nierenversagen nach Pteridinapplikation.
Klin. Wschr. 48, 1209 (1970)

23. BRADE, W., HERKEN, H. und MERKER, H.J.:
Schädigung und Regeneration renaler Tubuluszellen nach Folsäuregabe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.exp.Path. 262, 228 (1969)

24. BRADY, R.O., KANFER, J.N., MOCK, M.B. and FREDRICKSON, D.S.:
The metabolism of sphingomyelin.
II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55, 366 (1966)

25. BRADY, R.O., GAL, A.E., BRADLEY, R.M., MARTENSSON, E., WARSHAW, A.L. and LASTER, L.:
Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidtrihexosidase deficiency.
New Eng. J. Med. 276, 1163 (1967)

26. BRANDES, D.:
The role of lysosomes in cellular lytic processes.
III. Electron and histochemical changes in mammary tumors after treatment with Cytoxan and Vitamin A.
Lab. Invest. 15, 987 (1966)

27. BRANDES, D., ANTON, E., SCHOFIELD, B. and BARNARD, S.:
Role of lysosomal labilizers in treatment of mammary gland carcinoms with cyclophosphamide (NSC-26271): Preliminary report.
Cancer Chemotherap. Rep. 50, 47 (1966)

28. BROWN, A.C.
Electron microscope studies of phosphatases in the small intestine of Rana temporaria during larval development and metamorphosis.
Histochemie 12, 83 (1968)

29. CARR, I.:
Lysosome formation and surface changes in stimulated peritoneal cells.
Z. Zellforsch. 89, 328 (1968)

30. CAVALLI-SFORZA, L.:
Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart: Fischer 1969

31. COHN, Z.A. and HIRSCH, J.G.:
The isolation and properties of specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphnuclear leucocytes.
J. exp. Med. 112, 983 (1960)

32. CUPPAGE, F.E., NEAGOY, D.R. and TATE, A.:
Repair of the nephron following temporary occlusion of the renal pedicle.
Lab. Invest. 17, 666 (1967)

33. CUPPAGE, F.E. and TATE, A.:
Repair of the nephron following injury with mercuric chlorid.
Americ. J. Path. 51, 405 (1967)

34. DAEMS, W.Th., WISSE, E. and BREDEROO, P.:
Electron microscopy of the vacuolar apparatus.
pp. 64 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 1 (wie 45)

35. DALES, S.:
Role of lysosomes in cell-virus interactions.
pp. 69 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 2 (wie 45)

36. DARAVYAN, E.N.:
(Histochemical study of acid phosphatase activity in brain of different animals at different pH values.)
Izv. Akad. Nauk. Arm. SSR Biol. Nauki. 17, 35 (1964)

37. DAVISON, K. and CONNING, D.M.:
Enzyme histochemistry of the normal rat kidney.
pp. 148 ff in: DUBACH, U.C. (ed.):
Enzymes in urine and kidney.
Bern und Stuttgart: Huber 1968

38. DE DUVE, C.:
General principles.
pp. 1 ff in: ROODYN, D.B. (ed.). Enzyme cytology.
New York, London: Academic Press 1967

39. DE DUVE, C.:
The lysosomes.
Sci. Am. 208, 64 (1963)

40. DE DUVE, C.:
Principles of tissue fractionation.
J. Theoret. Biol. 6, 33 (1964)

41. DE DUVE, C.:
The lysosome concept.
pp. 1 ff in: DE REUCK, A.V.S. and CAMERON, M.P. (eds.):
Lysosomes, Ciba Found. Symp.
Boston: Little, Brown & Co. 1963

42. DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. and APPELMANS, F.:
Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.
Biochem. J. 60, 604 (1955)

43. DE DUVE, C. and WATTIAUX, R.:
Functions of lysosomes.
Annu. Rev. physiol. 28, 435 (1966)

44. DEHNEN, W.:
Hemmung der sauren Phosphatase aus Rattenleberlysosomen durch Citrat.
Naturwissenschaften 53, 332 (1966)

45. DINGLE, J.T. and FELL, H.B.:
Lysosomes in biology and pahtology.
Vol. 2. In der Reihe: Frontiers of biology.
Amsterdam, London: North Holland 1969

46. DINGLE, J.T., HAYES, M.F. and MOOR, R.M.:
Zit. nach:
SHAMBERGER, R.J.:
Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammary tumors.
Biochem. J. 111, 375 (1968)

47. DUBACH, U.C. und JÖSCH, W.:
Verhalten von Enzymen in Nierengewebe, Urin und Serum nach toxischer Schädigung des Nephrons an der Ratte.
Enzymol. biol. clin. 8, 401 (1967)

48. DUBACH, U.C. and SCHMIDT, U.:
Enzymology of human kidney. Review with special consideration of the quantitative histochemistry.
Enzymol. biol. clin. 11, 32 (1970)

49. EDWARDS, J.L. and KOCH, A.:
Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration.
Lab. Invest. 13, 32 (1964)

50. EECKHOUT, Y.:
The Content of acid hydrolases in the tail of Xenopus laevis during metamorphosis.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 72, 316 (1964)

51. EL-FIKY, S.M.:
Cytochemistry of a lysosomal enzyme in malignant cells of primary and secondary tumors.
Acta Histochem. 22, 215 (1965)

52. ERICSSON, J.L.E.:
Absorption and decomposition of homologous haemoglobin in renal proximal tubule cells. An experimental light and electron microscopic study.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 168, 1 (1964)

53. EVOLA-MALTESE, C.:
Histochemical localisation of alkaline phosphatase in the sea urchin embryo.
Acta embryol. morphol. exp. 1, 99 (1957)

54. FAKAN, F.:
Several cytochemical characteristics of normal and regenerating rat liver cultivated in vitro.
Acta Histochem. 26, 122 (1967)

55. FARQUHAR, M.G. and PALADE, G.E.:
Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus.
J. Cell. Biol. 13, 55 (1962)

56. FLASCHENTRÄGER, B.:
p. 1093 in: Physiologische Chemie, 1. Band.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1951

57. FRIEDKIN, M. and KORNBERG, A.:
p. 609 in: McELDROY, W.D. and GLASS, B. (eds.):
The Chemical Basis of Heredity.
Baltimore: Johns Hopkins 1957

58. GAYER, J. und KNÜFERMANN, H.:
Veränderungen im Enzym- und Substratgehalt der Nierenrinde des Kaninchens bei der experimentellen Glomerulonephritis.
Klin. Wschr. 47, 80 (1969)

59. GEIGY, J.R.:
Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen.
Basel: Eigenverlag 1955

60. GREENBERG, G.R. and JAENICKE, L.:
p. 204 in: WOLSTENHOLME, G.E.W. and O'CONNOR, C.M. (eds.):
The Chemistry and Biology of Purines.
London: Churchill 1957

61. GROSSOWICZ, N., IZAK, G. and RACHMILEWITZ, M.:
Folate activity in tissues of rats on folate-free diets.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 953 (1964)

62. GUENTHER, F. und BURCKHART, O.:
Eine Schnellmethode zur Bestimmung der alkalischen Gesamtphosphatase im Hühnereigelb.
Deut. Lebensmittelrundschau 10, 305 (1967)

63. HAGEN, U.:
Neuere Ergebnisse in der Biochemie der Strahlenwirkung, III.
Sammelreferat in:
Fortschr. Röntgenstr. 87, 789 (1957)

64. Von HAHN, H.P.:
Die Aktivität der sauren Phosphatase in Xenopus Larven.
II. Die normale Regeneration.
Helv. physiol. pharmakol. Acta 18, 80 (1960)

65. HAMBURGER, J., RICHET, G., CROSNIER, J., FUNCH-BRENTANO, J.L., ANTOINE, B., DUCROT, H., MERY, J.P. and DE MONTERA, H.:
Nephrology. Vol. 1.
Philadelphia, London, Toronto: Saunders 1968

66. HARRIS, J.W.:
Studies of irradiated lysosomes with particular reference to the action of calcium.
Exp. Cell. Res. 45, 487 (1967)

67. HARRIS, J.W.:
Binding of sulfhydrylreagents to normal and irradiated leucocyte lysosomes.
Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 46, 209 (1968)

68. HATT, P.Y.:
The juxtaglomerular apparatus.
pp. 101 ff in: DALTON, A.J. and HAGUENAU, F. (eds.):
Ultrastructure of the kidney.
New York: Academic Press 1967

69. HAVA, N.:
Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases.
J. biol. Chem. 234, 4671 (1967)

70. HERKEN, H., VOSS, P., BRADE, W. und KOLBE, H.:
Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the regenerating kidney after lesions by drugs.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 267, 297 (1970)

71. HERS, H.G.:
α-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease).
Biochem. J. 86, 11 (1963)

72. HERS, H.G. and Van HOOF, F.:
Genetic abnormalities of lysosomes.
pp. 19 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 2 (wie 45)

73. HERS, H.G. and Van HOOF, F.:
The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidosis.
Europ. J. Biochem. 7, 34 (1968)

74. HIGASHI, H., HIRAO, S., YAMADA, J. and KIKUCHI, R.:
Vitamin contents in the lamprey, Entosphenus Japonicus Martens.
J. Vitam. 4, 88 (1958)

75. HIRSCH, G.H. and HOOK, J.B.:
Stimulation of renal p-aminohippurate by folic acid.
Biochem. Pharmac. Vol. 18. pp. 2274 ff (1969)

76. HOFFMANN-OSTENHOF, H. und EHRENREICH, R.:
Phosphoester-Hydrolasen.
pp. 692 ff in: LANG, K. und LEHNARTZ, E. (Hrsg.):
Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch- Chemischen Analyse, VI, B, von Hoppe-Seyler/Thierfelder.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1966

77. HORVAT, A. and TOUSTER, O.:
Biochemical characterisation of the lysosomes of Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 148, 725 (1967)

78. HÜBNER, K. und KEMPF, P.:
Histoautoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese der Nieren nach Sublimatvergiftung.
Med. Welt 19, 2867 (1968)

79. HUENNEKENS, F.M., OSBORN, M.J. and WHITELEY, H.R.:
Folic acid coenzymes.
Science 128, 120 (1958)

80. HURVIC, M. and DANCEWIZC, A.M.:
Biochemical lesions induced in subcellular structures by ionizing radiation. V. The activity of alkaline and acid phosphatase in rat liver and spleen.
Nukleonika 12, 577 (1967)

81. JÄHDE, M.:
Über Phosphatasen des Hühnerembryos.
Diss. med. vet., München 1970

82. JOHNSON, H.A. and ROMAN, J.M.V.:
Compensatory renal enlargement: hypertrophy versus hyperplasia.
Amer. J. Path. 49, 1 (1966)

83. JØRGENSEN, F.:
The ultrastructure of the normal human glomerulus.
Kopenhagen: Munksgaard 1966

84. KÄRCHER, K.H.:
Strahlenklinische Histologie.
pp. 68 ff in: Einführung in die klinisch-experimentelle Radiologie.
München, Berlin: Urban und Schwarzenberg 1964

85. KAMPSCHMIDT, R.F.:
Acid hydrolases activity during the growth, necrosis and regression of the Jensens sarcoma.
Cancer Res. 28, 1938 (1968)

86. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Stuttgart: Thieme 1970

87. KLOCKARS, M. and WEGELIUS, O.:
Lysosomal enzymes in regenerating rat liver.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 218 (1969)

88. KRAUT, H. und WEISCHER, Ä.:
Esterasen.
pp. 1070 ff in: FLASCHENTRÄGER, B. und LEHNARTZ, E.(Hrsg.): Physiologische Chemie, Bd.I.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957

89. KRISCH, K.:
Lysosomen.
Deut. med. Wschr. 91, 1274 (1966)

90. KÜNZEL, E.:
Die Entwicklung des Hühnchens im Ei.
Berlin und Hamburg: Parey 1962

91. LINEWEAVER, H. and BURK, D.:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

92. MAGGI, V.:
A study of lysosomal acid phosphatase during mitosis in HeLa cells.
J. Roy. Microscop. Soc. 85, 291 (1966)

93. MAGGI, V.:
Acid phosphatases in differentiated and undifferentiated tumors of the mouse.
Biochem. J. 106, 21 (1968)

94. MATTENHEIMER, H.:
Enzymology of kidney tissues.
pp. 119 ff in: DUBACH, U.C. (ed.): Enzymes in urine and kidney.
Bern und Stuttgart: Huber 1968

95. MATTENHEIMER, H.:
Der Aussagewert von Enzymbestimmungen im Urin.
pp. 355 ff in: Praktische Enzymologie.
Bern und Stuttgart: Huber 1968

96. MAUNSBACH, A.B.:
Functions of lysosomes in kidney cells.
pp. 114 ff in: Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 1 (wie 45)

97. McWHINNIE, D.J. and SAUNDERS, J.W.:
Development patterns and specifities of alkaline phosphatase in the embryonic chick limb.
Develop. Biol. 14, 169 (1966)

98. MELANI, F.:
A kinetic study of rat kidney alkaline phosphatase.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 122, 417 (1967)

99. MERKER, H.J.:
Struktur und Funktion der Lysosomen.
Mat. Med. Nordmark XVII (15), 657 (1965)

100. MICHIELSEN, P.:
Bijdrage tot de studie van de intercapillaire cellen van de glomerulus, een elektronenmikroscopisch onderzoek.
Brüssel: Arscia Uitgaven, N.V. 1962

101. MILLER, N.R.:
The nature and localisation of acid phosphatase during the early phases of urodele limb regeneration.
Develop. Biol. 17, 447 (1968)

102. MILLER, F. and PALADE, G.E.
Lytic activities in renal protein absorption droplets.
J. Cell. Biol. 23, 519 (1964)

103. MOOG, F.:
The differentiation of enzymes in relation to the functional activities of developing embryo.
Ann. N.Y. Acad. sci. 55, 57 (1952)

104. MOOG, F.
Localisation of alkaline and acid phosphatases in the early embryogenesis of the chick.
Biol. Bull. 86, 51 (1944)

105. MÜLLER, M., RÖHLICH, P., TOTH, J. and TÖRÖ, I.:
Fine structure and enzymic activity of Protozoan food vacuoles.
pp. 201 ff in: Ciba Symposion 1963 (wie 41)

106. NEUFANG, H.-R.:
Zur Wirkung von Ganzkörperröntgenbestrahlung und 2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin auf die Ausscheidung von Elektrolyten und Stoffwechselprodukten im Harn von Ratten.
Diss. med. vet., München 1967

107. NIEHUS, B. und Von HAHN, H.P.:
Die Aktivität der sauren Phosphatase im Schwanzgewebe von hungernden und gefütterten Xenopuslarven.
Helv. Physiol. Pharmakol. Acta 18, 33 (1960)

108. NIKOLOV, T.K. and IORDANOVA, D.:
(Activity of DNase I and DNase II in subcellular fractions of rat liver during regeneration.)
Eksp. Mod. Morfol. 9, 34 (1970)

109. NOAMAN, M., HAMDY, M.K. and CASTER, W.O.:
Effect of gamma irradiation and radioprotectors on alkaline phosphatase and ATPase.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129, 782 (1968)

110. NOTO, T.:
The effects of some carcinogens on morphogenesis and differentiation in the early chick embryo.
Sci. Rep, Tohoku Uni., 4th.ser. 33, 65 (1967)

111. NOVIKOFF, A.B.
The rat kidney: cytochemical and electron microscopic studies.
pp. 113 ff in: QUINN, E.L. and KASS, E.H.(eds.):
Biology of the pyelonephritis.
Boston: Little, Brown & Co. 1960

112. NOVIKOFF, A.B.:
The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 136 (1959)

113. NOVIKOFF, A.B.:
Lysosomes and related particles.
pp. 432 ff in: BRACHET, J. and MIRSKY, A.E.(eds.):
The cell. Vol. 2.
New York: Academic Press 1961

114. NOVIKOFF, A.B. and ESSNER, E.:
Cytolysosomes and mitochondrial degeneration.
J. Cell. Biol. 15, 140 (1962)

115. NOVIKOFF, A.B., ESSNER, E. and QUINTANA, N.:
Golgi apparatus and lysosomes.
Fed. Proc. 23, 1010 (1964)

116. PATRICK, A.D.:
A deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease.
Biochem. J. 97, 17C (1965)

117. PATT, H.M. and QUASTLER, H.:
Radiation effects on cell renewal and related systems.
Physiol. Rev. 43, 357 (1963)

118. PAULSON, D.:
Viral neoplastic transformation of hamster prostate tissue in vitro.
Science 159, 200 (1968)

119. PITTS, R.F.:
Physiology of the kidney and body fluids.
Chicago: Year Book Medical Publ. 1963

120. PRENSKY, A.L., FERREIRA, G., CARR, S. and MOSER, H.W.:
Ceramide and ganglioside accumulation in Farber's lipogranulomatosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 725 (1967)

121. RAAB, W.:
Enzymes and isoenzymes in urine.
pp. 17 ff in: DUBACH, U.C. (ed.): Enzymes in urine and kidney.
Bern und Stuttgart: Huber 1968

122. RAAB, W.:
Experimentelle Steigerung der alkalischen-Phosphatase-Aktivität des Rattenharnes.
Z. Vit.-Horm.-und Fermentforsch. 14, 336 (1967)

123. RAAB, W., HOHENEGGER, M. and KAISER, E.:
Nephrotoxic action of d-serine determined by renal enzyme excretion in rats.
Pharmacology 2, 82 (1969)

124. RAHMAN, Y.E.:
A note of acid phosphatase release from spleen, liver and thymus of rats.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 90, 440 (1964

125. REIF, W. und LANGE, H.P.:
Nierenregeneration nach temporärer Ischämie. Biochemische, histochemische, fluoreszenzmikroskopische und histologische Untersuchungen über den Nucleinsäure- und Proteinstoff-wechsel.
Beitr. path. Anat. 138, 450 (1969

126. RHODIN, J.A.G.:
Electron microscopy of the kidney.
pp. 117 ff in: BLACK, D.A.K. (ed.): Renal disease.
Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1962

127. ROHR, H.P.:
Die funktionelle Bedeutung der Lysosomen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Schweiz. med. Wschr. 96, 1712 (1966)

128. RUPEC, M.:
Die Lysosomen.
Z. Haut-Geschl.-Krkh. 45, 2, 67 (1970)

129. SANDHOFF, K., ANDREAE, U. and JATZKEWITZ, H.:
Deficient hexosaminidase activity in an experimental case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs.
Life Sci. 7, 283 (1968)

130. SCHEIB, D.:
Acid phosphatases in the regression of the Müllerian ducts (chick embryo). Histochemical studies.
Ann. Histochim. 9, 99 (1964)

131. SCHEIB, D.:
Properties and role of acid hydrolases of the Müllerian ducts during sexual differentiation in the male chick embryo.
p. 264 in: Lysosomes (wie 41)

132. SCHMIDT, U., DUBACH, U.C. and TORHORST, J.:
Behavior of sodium-potassium- activated adenosin-triphosphatase in rat kidney tissue with folic acid.
Experientia 25, 1288 (1969)

133. SCHULTZE, H.E. and HEREMANS, J.F.:
Molecular biology of human proteins.
Vol. 1
Amsterdam: Elsevier 1966

134. SHAMBERGER, R.J.:
Increase of lysosomal enzymes in skin cancers (mouse, rat, pheasant, aves).
Nature (London) 213, 617 (1967)

135. SHAMBERGER, R.J.:
Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammary tumors.
Biochem. J. 8, 139 (1969)

136. SHEAR, D.B.:
A chemical relaxion study of human prostatic acid phosphatase.
Biophys. J. 8, 139 (1968)

137. SHIBKO, S. and TAPPEL, A.L.
Rat-kidney lysosomes: isolation and properties.
Biochem. J. 95, 731 (1965)

138. SIEBERT, G.:
Desoxyribonucleasen.
pp. 1061 ff in: LANG, K. und LEHNARTZ, E. (Hrsg.):
Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch- Chemischen Analyse VI, B, von Hoppe-Seyler/Thierfelder.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1966

139. SLATER, T.F., GREENBAUM, A.L. and WANG, D.Y.:
Lysosomal changes in liver injury and mammary involution.
p. 311 in: Lysosomes (wie 41)

140. SMITH, C.J.:
Alteration of epithelian lysosomes during (human) oral carcinogenesis.
J. Dent. Res. 43, 948 (1964)

141. SMITH, J.K.:
The heterogeneity of prostatic acid phosphatase.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 131, 607 (1968)

142. SMITH, R.E. and FARQUHAR, M.G.:
Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland.
J. Cell. Biol. 31, 319 (1966)

143. STRAUS, W.:
Occurence of phagosomes and phagolysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion, and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase.
J. Cell. Biol. 21, 295 (1964)

144. STRAUS, W.:
Lysosomes, phagosomes and related particles.
pp. 239 ff in: ROODYN, D.B.(ed.): Enzyme cytology.
New York: Academic Press 1967

145. SUOMALANIEN, H.:
Changes in the phosphatase activity of Baker yeast during the growth phase and localisation of the phosphatases in the yeast cell.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 37, 482 (1960)

146. SZIGETI, M.:
Age dependent changes in level of lysosomal enzymes in the lymphatic organs of guinea pig.
Acta biol. (Budapest) 19, 305 (1968)

147. TAPPEL, A.L.:
Lysosomes.
pp. 77 ff in: FLORKIN, M. and STOTZ, E.H. (eds.):
Comprehensive biochemistry.
Amsterdam, London, New York: Elsevier 1968

148. TAPPEL, A.L., SAWANT, P.L. and SHIBKO, S.:
Lysosomes: Distribution in animals, hydrolytic capacity and other properties.
p. 78 in: Lysosomes (wie 41)

149. TAYLOR, D.M., THRELFALL, G. and BUCK, A.T.:
Chemically induced renal hypertrophy in the rat.
Biochem. Pharmacol. 17, 1567 (1968)

150. TEMPEL, K.:
Phosphatasen der Maus unter dem Einfluß von Polyvinylsulfat.
Arzneimittelforschung 19, 1611 (1968)

151. TEMPEL, K.:
Zu Biochemie und Funktion der Lysosomen.
Medizin und Ernährung 8, 101 (1967)

152. TEMPEL, K.:
Induktion eines DNase I-Inhibitors in der Niere der Maus durch Folsäure.
Referat, gehalten auf der 12.Frühjahrstagung der Deut. Pharmak. Ges. Mainz 1971

153. TEMPEL, K.:
Desoxyribonucleasen in Mäusenieren unter dem Einfluß von Folsäure.
Z. Naturforsch. im Druck

154. TESORIERE, G.:
Dephosphorylation of glucosamine 6-phosphate in rat liver homogenates.
G. biochim. 16, 209 (1967)

155. THER, L.:
Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung.
Stuttgart: Wiss. Verlagsges. 1965

156. THRELFALL, G.:
Cell proliferation in the rat kidney induced by folic acid.
Cell and Tissue Kinetics 1, 383 (1968)

157. THRELFALL, G. and TAYLOR, D.M.:
Modification of folic acid-induced changes in renal nucleic acid and protein synthesis by Actinomycin D and Cycloheximide.
European. J. Biochem. 8, 591 (1969)

158. THRELFALL, G., TAYLOR, D.M. and BUCK, A.T.:
The effect of folic acid on growth and deoxyribonucleic acid synthesis in the rat kidney.
Lab. Invest. 15, 1477 (1966)

159. THRELFALL, G., TAYLOR, D.M. and BUCK, A.T.:
Studies of the changes in growth and DNA-synthesis in the rat kidney during experimental induced renal hypertrophy.
Americ. J. Pathol. 50, 1 (1967)

160. TILSON, D.M.:
A dissimilar effect of folic acid upon growth of the rat kidney and small bowel.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 95 (1970)

161. VORBRODT, A.:
Cytochemical studies of lysosomal enzymes during early stages in rat liver regeneration.
Fol. Histochem. Cytochem. 5, 231 (1967)

162. VORBRODT, A.:
Cytochemical and histochemical investigations on phosphatase activity in normal, regenerating and irradiated liver in rats.
Fol. morphol. 10, 143 (1959)

163. WANG, K.M.:
ZnII-activated acid phosphatase in liver and metanephrons of developing chick.
Experientia 24, 424 (1968)

164. WATTIAUX, R.:
Biochemistry and function of lysosomes.
pp. 1160 ff in: LIMA-DE-FARIA, A. (ed.):
Handbook of Molecular Cytology.
Amsterdam, London: North-Holland 1969

165. WEBER, R.:
p. 332 in: The biochemistry of animal development. Vol.I:
Descriptive biochemistry of animal development.
London, New York: Academic Press 1967

166. WEBER, R.:
Behaviour and properties of acid hydrolases in regressing tail of tadpoles during spontaneous and induced metamorphosis in vitro.
p. 282 in: Lysosomes (wie 41)

167. WEISSMANN, G.:
The role of lysosomes in inflammation and disease.
Ann. Rev. Med. 18, 97 (1967)

168. WEISSMANN, G., SESSA, G. and BEVANS, V.:
Effect of DMSO on the stabilisation of lysosomes by cortisone and chloroquine in vitro.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 141, 326 (1967)

169. WERLE, E. und SCHIEVELBEIN, H.:
Niere und Harn.
pp. 1 ff in: FLASCHENTRÄGER, B. und LEHNARTZ, E.(Hrsg.):
Physiologische Chemie, Bd. II/2 b.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957

170. WOESSNER, J.F.:
Acid hydrolases of the rat uterus in relation to pregnancy, post partum involution and collagen breakdown.
Biochem. J. 97, 855 (1965)

171. WOESSNER, J.F. and BREWER, I.H.:
Zit. nach: SHAMBERGER, R.J.:
Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammary tumors.
Biochem. J. 111, 375 (1968)

Herrn Univ.Doz. Dr. K. T e m p e l danke ich für die Überlassung des Themas und Anleitung bei der Ausführung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 15. Januar 1944 wurde ich als Sohn des später gefallenen stud.rer.pol. Johannes Hollatz und seiner Ehefrau Marianne, geb. Salzberger in Prag geboren.
Nach 4 Jahren Volksschule trat ich 1954 auf das humanistische Wilhelmsgymnasium in München über. Im Juni 1964 legte ich am Maximiliansgymnasium in München die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium und schloß es am 31. Juli 1969 mit dem Staatsexamen ab. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 26. Januar 1970.
Am 15. Dezember 1970 heiratete ich die Stud.Referendarin Luise, geb. Arnold.
Seit 1. April 1970 bin ich als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wiss. Ass. am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie beschäftigt.